

Università degli Studi di Napoli

“Federico II”



Facoltà di Agraria - Portici

Dottorato di ricerca XXIV ciclo in:

Produzione e Sanità degli alimenti di origine animale

Indirizzo:

Scienze dell' Allevamento Animale

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta,  
dell'Ambiente e delle Produzioni Animali

Tesi di Dottorato

Studio comparativo dell'espressione delle Isoforme di miosina, della  
proteina PAX 7 e delle proprietà morfo - funzionali su vari muscoli di  
suino Casertano e Large White

*Dr.<sup>ssa</sup> Claudia Vitale*

**Relatore**

Chiar.mo Prof.  
Antonio Crasto

**Coordinatore**

Ch.ma Prof.<sup>ssa</sup>  
Maria Luisa Cortesi

<b>Indice</b>	
<b>Parte generale</b>	<b>2</b>
<i>Comparto carni suine in Campania</i>	3
<i>Scopo del lavoro</i>	4
<i>Razze suine italiane da carne</i>	6
<i>Suino Nero Casertano</i>	6
<i>Suino Large White</i>	8
<i>Caratteristiche delle carni di suino nero Casertano</i>	10
<i>Caratteristiche generali della carne suina</i>	13
<i>Prodotti carnei di suino</i>	18
<i>Struttura muscolare: generalità e caratteristiche</i>	22
<i>Tessuto muscolare: le fibre</i>	24
<i>Fattori di crescita: generalità e struttura della miostatina</i>	27
<i>Esame della letteratura</i>	31
<b>Parte sperimentale</b>	<b>35</b>
<i>Materiali e metodi</i>	36
<i>Dieta</i>	36
<i>Tipizzazione istochimica</i>	37
<i>Tipizzazione immunoistochimica MHC</i>	39
<i>Studio elettroforetico delle isoforme di MHC</i>	40
<i>Quantificazione dell'MHC ottenuta mediante analisi elettroforetica</i>	41
<i>Studio di espressione quali e quantitativa del gene per l'isoforma di tipo 2B</i>	41
<i>Tipizzazione immunoistochimica: gene Pax 7</i>	42
<i>Ibridazione in situ su tessuto muscolare congelato</i>	43
<i>Espressione dei fattori appartenenti alle superfamiglie IGF e dei TGF-beta</i>	44
<i>Espressione della miostatina in animali ad alta e bassa muscolarità</i>	44
<i>Risultati e discussioni</i>	46
<i>Istochimica</i>	46
<i>Immunoistochimica</i>	50
<i>Isoforme MHC</i>	50
<i>Elettroforesi e RT-PCR</i>	51
<i>Gene Pax 7</i>	54
<i>RT-PCR Pax 7-IgF-TGF<math>\beta</math></i>	56
<i>Ibridazione in situ e immunoistochimica: Miostatina e Miogenina</i>	60
<i>Valutazione della crescita corporea e della carcassa</i>	61
<i>Conclusioni: Impatto della ricerca nelle produzioni alimentari</i>	65
<i>Figure</i>	66
<i>Bibliografia</i>	81

## ***Parte generale***

### **Comparto carni suine in Campania**

La Campania, per la sua nota fertilità, dovuta alle favorevoli condizioni climatiche, è una regione ricchissima ed apprezzata per la tipicità e la tradizionalità delle produzioni agro-alimentari.

La zootecnia Campana sia in termini di diversa vocazione all'allevamento nei differenti comuni sia di utilizzazione dei terreni, presenta dei caratteri molto variegati e dunque dei comparti produttivi dominanti nei diversi ambiti territoriali.

Al cospetto delle problematiche risultanti da un territorio spaccato, la regione Campania ha appoggiato lo sviluppo del progetto suino mediterraneo al fine di evidenziare le problematiche del settore e soprattutto le potenzialità ad esso intrinseche ed i fattori endogeni di sviluppo. Al riguardo non sono stati trascurati i risultati di numerosi studi che hanno contribuito a documentare la non omogeneità del territorio e le forti peculiarità di talune aree all'interno della Regione, infatti il sistema economico produttivo ripropone il dualismo tra aree fortemente urbanizzate e pianeggianti, da un lato, e quelle interne, dall'altro, marginalizzate il più delle volte rispetto alle dinamiche di sviluppo delle aree di pianura.

La suinicoltura Campana rappresenta un punto di riferimento centrale in qualsiasi progetto di rilancio del sistema agroalimentare.

I prodotti della zootecnia, costituiscono non solo la materia prima per dar vita alle specialità più notevoli della tradizione agroalimentare Campana ma anche un modo per trattenere in agricoltura una fetta consistente del valore.

Un dato fondamentale relativo alla suinicoltura italiana è rappresentato dalla specializzazione nella produzione del suino pesante (cioè quello con un peso vivo alla macellazione superiore ai 160 kg), necessario soprattutto per la produzione dei prosciutti crudi italiani protetti dal marchio DOP (Prosciutto di Parma e Prosciutto di S. Daniele). Quindi studiare le caratteristiche strutturali, fisiologiche della muscolatura dei suini Campani, (quali ad esempio il Casertano) e confrontare tali caratteristiche con quelle dei suini pesanti può permettere l'espansione della domanda dei prodotti locali favorendo il raggiungimento di migliori obiettivi di sviluppo da parte del settore suinicolo Campano.

Si potrebbe in effetti promuovere una produzione zootecnica economicamente ed ecologicamente efficace e sicura, prestando attenzione anche agli obiettivi programmatici di settore.

### **Scopo del lavoro**

Lo scopo di tale ricerca è stato quello di esaminare la correlazione tra composizione in tipi di fibre e qualità della carne suina, le caratteristiche organolettiche e l'attitudine alla trasformazione in prosciutto da parte dell'industria alimentare.

Il suino rappresenta una specie d'allevamento che si differenzia da tutte le altre principalmente per due motivi:

- per la presenza nella muscolatura scheletrica di tutte le isoforme della MHC (tipo 1, 2A, 2X e 2B) rispetto alle altre specie d'allevamento o all'uomo dove manca la 2B; (gene recessivo).
- per la comparsa a circa quattro settimane di vita di una nuova fase di crescita iperplastica dovuta alla formazione di miotubi di 3° generazione.

Queste due caratteristiche condizionano la muscolarità specifica di questa specie e ne fanno un ottimo modello di studio per verificare come la selezione, per la produzione della carne, abbia influito sulla crescita iperplastica e ipertrofica.

Con la presente ricerca si è cercato di creare un modello matematico di previsione della crescita corporea, (muscolarità) basato sui fattori determinanti la potenzialità delle produzioni da parte degli animali allevati (fattori genetici, nutrizionali e ambientali).

Visto che i parametri nutrizionali e ambientali sono facilmente verificabili, in tale ricerca si sono voluti identificare ed inserire anche alcuni parametri genetici che tenessero conto delle caratteristiche proprie della muscolarità del suino (isoforma di tipo 2B e iperplasia).

Si è quindi analizzato il tempo di comparsa dell'isoforma del tipo 2B durante lo sviluppo e l'accrescimento in muscoli a diversa composizione in tipi di fibre quali muscolo semimembranoso, semitendinoso, bicipite femorale e quadricipite femorale .

Poiché ogni metodica utilizzata, presenta vantaggi ma anche limiti sistematici, la ricerca è stata condotta su base istochimica, immunoistochimica ed elettroforetica per lo studio delle isoforme proteiche e di biologia molecolare per l'espressione dei geni delle diverse isoforme dell'MHC.

Sono stati inoltre impiegati approcci non solo di tipo qualitativo ma anche di tipo quantitativo per ogni tipologia di muscolo.

Per lo studio delle cause della comparsa dell'iperplasia post natale, sono stati studiati l'espressione e la localizzazione dei fattori di crescita che nei mammiferi sono coinvolti nello sviluppo e differenziamento del muscolo scheletrico.

Nella ricerca si sono inoltre esaminati:

- fattori miogenici trascrizionali quali MyoD, Myf5, Miogenina, MRF4 e MEF2;
- geni quale il gene Pax 7 che agiscono sulle cellule staminali pluripotenti differenziandole in precursori miogenici;
- espressione dei fattori appartenenti alle superfamiglie delle IGF e dei TGF- $\beta$ ;
- espressione della miostatina.

## **Razze suine Italiane da carne**

### **Suino Nero Casertano**

La razza Casertana (o suino "Nero Casertano" o "razza Napoletana" o ancora "pelatella Napoletana") ha origini antichissime, tanto da essere rappresentata in molte sculture e



affreschi di epoca romana. In passato, è stata considerata una razza molto pregiata ed importante per la vastità della sua area di diffusione: comunemente allevata in Campania e nelle regioni vicine, perfettamente adattata agli ambienti poveri, in modo particolare alle zone collinari della provincia di Caserta. Questa razza autoctona, oggi

è allevata tra la Campania, il Molise e le province di Latina e Frosinone ed è tra le sei razze di suini italiani in via di estinzione (Casertana, Cinta Senese, Calabrese, Sarda, Siciliana, Mora Romagnola), soprattutto a causa delle ridotte dimensioni delle loro popolazioni e della poca valorizzazione economica delle loro potenzialità. La razza Casertana possiede tutte le caratteristiche per essere allevata all'aperto, è, infatti, un animale rustico, capace di valorizzare alimenti poveri, frugale e precoce, dotato di spiccata attitudine per l'ingrasso e suscettibile di una buona resa al macello, in carne e grasso.

#### Caratteristiche morfologiche

L'attuale standard del Tipo Genetico Autoctono "Casertana" prevede un animale rustico, di media taglia, con scheletro ridotto e arti brevi, asciutti e sottili, garretti e pastorali talvolta dritti, con colore della cute che va dal nero violaceo al grigio ardesia. La cute è priva di setole, talvolta presenti solo in radi ciuffetti su collo, testa ed estremità della coda.

La testa appare di medio sviluppo, piccola e leggera, di forma tronco conica, con profilo nasale rettilineo o appena concavo, grugno lungo e sottile, orecchie ravvicinate tra loro, portate in basso e in avanti, il collo allungato e stretto lateralmente. Caratteristica peculiare della razza è la presenza, ai lati del collo, nella regione parotideale, di due protuberanze della cute denominate "bargigli, tettole", ossia pendenti, orecchini, caratteristica questa solo della Casertana e della razza Sarda. Il tronco appare moderatamente lungo e stretto, schiacciato nella regione toracica.

Linea dorso-lombare convessa, groppa caratteristicamente inclinata, spalle leggere, cosce poco convesse e coda attorcigliata. Il maschio presenta testicoli ben pronunciati e capezzoli in numero non inferiore a 10.

La femmina ha mammelle in numero non inferiore a 10, regolarmente distanziate, con capezzoli normali ben pronunciati e pervii.

#### Allevamento e produttività

La tecnica di allevamento tradizionale prevede un largo uso di pascolo nei boschi di faggio, di castagna o di quercia, con scarsa integrazione di mangimi e con ampi spazi dove il suino Nero Casertano possa brucare liberamente. Attualmente molti capi vengono ingrassati secondo le moderne tecniche di allevamento, con l'uso di nuclei proteici e mangimi integrati. Allevato allo stato brado e semibrado nelle querce, il maiale Nero Casertano offre lardo e carni marezzate tenere, compatte e saporite (grazie all'alimentazione a base di ghiande e castagne).

La prolificità è limitata, con una media di 4-6 suinetti per parto ed un massimo di 10. Razza precoce: ad un anno le scrofe pesano 120-140 Kg, i verri 150-170 Kg. La razza, inoltre, sembra essere priva del gene alotano che causa la produzione di carni PSE (Pale, Soft and Exsudative), non adatte alla produzione di prosciutti di qualità.





### ***Suino Large White***

E' forse la razza suina più conosciuta ed apprezzata nel mondo. La sua formazione risale al XVIII secolo e la sua culla si ebbe nella contea di York partendo da scrofe locali e verri importati dall'Oriente (cinesi, siamesi). Dal 1860 circa vennero ufficialmente riconosciuti i caratteri morfologici ed attitudinali che ben presto dovevano interessare il mondo: spiccate precocità e prolificità, grande mole, notevole attitudine alla produzione di carne, scheletro relativamente ridotto ed elevate rese di macellazione. Introdotta in Italia nel 1873 si è diffusa in tutta la Valle Padana e nell'Italia Centrale, meno nel Sud, dando vita a centri di selezione e, soprattutto, impulso all'indirizzo univoco di miglioramento della suinicoltura locale con incrocio di sostituzione; contemporaneamente, nell'Italia Centrale si dava l'avvio alla forma di incrocio detto industriale. La Large White è ritenuta insuperabile per la produzione di carne, tanto per il consumo diretto quanto per il salumificio. Oltre che dalla precocità e robusta costituzione, la meritata fama della razza deriva dalla elevata prolificità (12-14 maialini) congiunta alla capacità di allattamento ed allevamento della nidiata uniforme fino allo svezzamento.

#### *Caratteristiche morfologiche*

L'Associazione Nazionale Allevatori Suini (ANAS) gestisce il libro genealogico della razza Large White italiana.

Tipo: vivace, robusto, rustico, di buona taglia, non adiposo; scheletro solido, conformazione armonica.

Mantello e Pigmentazione: setole bianche; cute depigmentata (rosea); è tollerata la presenza di qualche piccola macchia nera o ardesia nettamente delimitata.

Testa: forte, leggera, con fronte larga e faccia di media lunghezza a profilo fronto-nasale leggermente concavo o rettilineo; grugno di buono sviluppo; mascelle larghe, robuste e nette; guance e gola larghe; orecchie erette con apertura del padiglione diretta in avanti.

Collo: di lunghezza moderata ma non troppo corto, relativamente più muscoloso nel maschio ed armonicamente attaccato al tronco.

Tronco: sufficientemente lungo, profondo, di forma cilindrica depressa lateralmente; spalle muscolose e ben fasciate; petto largo e profondo; dorso e lombi muscolosi ed uniformemente larghi, formanti una linea tendente all'orizzontale che si raccorda armonicamente con le regioni del garrese e della groppa; groppa larga, lunga e muscolosa; coda robusta, attaccata alta nel punto di passaggio tra groppa e natiche; natiche ben convesse; costato e fianchi ben discesi ed armonicamente collegati alla regione dorso-lombare; ventre ampio, sostenuto, formante con lo sterno una linea diritta e orizzontale; prosciutto quale risulta dalla descrizione della groppa e della natica e quindi, nel complesso, molto sviluppato in senso antero-posteriore, spesso, muscoloso, ben disceso.

Arti: di media lunghezza con articolazioni nette, robuste ed in perfetto appiombo; pastorali di media lunghezza e piedi solidi con unghielli larghi, corti, ben serrati ed uniformi. Andatura: agile, elastica, sicura.

### **Caratteristiche della carne di suino Nero Casertano**

Il suino 'Casertana' è stato distinto in tre tipi:

- (a) grande: altezza al garrese 0,70 ÷ 0,75 cm;
- (b) medio: caratteristiche somatiche di taglia intermedia;
- (c) piccolo: altezza al garrese 0,60 + 0,65 cm.

È il tipo genetico ideale per la produzione del 'suino pesante', considerando che il suo peso ideale di macellazione è di un minimo di 160 kg di peso vivo. Analisi effettuate sulle carni di soggetti appartenenti al TGA 'Casertana' (CT), confrontati con soggetti Large White (LW), Landrace x LW, Duroc (Du) e Spotted Poland (SP), hanno evidenziato che:

- (a) il tipo genetico risulta un'importante fonte di variazione e che la 'Casertana' fornisce la carne con il migliore valore di masticabilità, nonché la carne più "chiara";
- (b) con l'aumentare del peso vivo alla mattazione, la carne di CT, richiede un maggior lavoro di masticazione, libera meno acqua durante la compressione e risulta più "scura".

Dall'analisi dei rilievi alla mattazione condotta sugli stessi soggetti, si evince che:

- (a) la CT fornisce una resa sul peso vivo netto dell'86 %, dovuta a una minore incidenza del quinto quarto;
- (b) la CT è caratterizzata da una minore lunghezza delle mezzene e da un più elevato spessore del grasso dorsale a livello toracico (3,6 cm) e lombare (4,4 cm).

Dai rilievi alla sezionatura si riscontra che la carcassa del maschio castrato, rispetto a quella della femmina intera, fornisce una maggiore percentuale di tagli carnosì e una minore di tagli adiposi.

È da sottolineare una maggiore incidenza nel maschio castrato del prosciutto di spalla sul totale dei tagli carnosì.

Al contrario, nelle femmine intere, la lombata è il taglio più rappresentato tra quelli carnosì e il lardo tra quelli adiposi.

La differenza tra i due sessi è evidente anche per quanto attiene l'incidenza del quinto quarto; esso ha un maggior sviluppo nei maschi castrati, rispetto alle femmine intere, con una variabilità maggiore in queste ultime.

In passato una certa politica di mercato ha, spesso, ingigantito i demeriti della carne suina e dei suoi derivati in quanto ritenuti troppo ricchi in acidi grassi saturi, quindi ricchi in colesterolo e, pertanto, poco idonei alla salvaguardia della salute.

L'evoluzione degli studi sulle caratteristiche organolettiche della carne suina, invece, sta consentendo di evidenziare alcuni "aspetti salutistici" della stessa, grazie ad una elevata nutrizionalità per la presenza di aminoacidi essenziali ramificati quali valina, leucina, e isoleucina importanti per la funzione ed efficienza dell'apparato locomotore e del sistema nervoso centrale. Altri "aspetti salutistici" della carne suina sono in relazione all'elevato potere di alcuni acidi grassi insaturi e polinsaturi presenti al livello del tessuto adiposo. La componente fatidica della parte lipidica degli alimenti di origine animale è influenzata, tra l'altro, dalle tecniche di allevamento. L'alimentazione con "foraggi verdi" risulta preziosa per il riequilibrio della composizione acidica della frazione lipidica. Infatti tale alimentazione, comportando una diminuzione degli acidi grassi saturi e un aumento degli acidi grassi insaturi, migliora il rapporto ac. gr. ins./ac. gr. sat., al quale si sta attribuendo un ruolo sempre più importante nella prevenzione e/o nella riduzione del cancro, di arteriosclerosi ed obesità. In particolare, nella specie suina, è stato constatato che l'alimentazione su pascolo di erba e di ghiande 60 giorni prima della macellazione e senza integrazione di mangimi, rispetto a quelli alimentati esclusivamente con mangimi, presentano un contenuto di acidi grassi monoinsaturi maggiore e una percentuale inferiore degli acidi grassi saturi nei trigliceridi muscolari. Inoltre il tessuto muscolare dei suini alimentati solo con mangimi avrebbe una maggiore predisposizione all'ossidazione e tali differenze sarebbero dovute oltre a una composizione acidica degli alimenti anche ad una maggiore introduzione di  $\alpha$ -tocoferolo attraverso il "pascolo".

Il sistema di allevamento all'aperto e quindi anche di alimentazione su pascoli d'erba e ghiande va ad influenzare positivamente e significativamente anche il contenuto del CLA (acido linoleico coniugato) un particolare gruppo di acidi grassi polinsaturi ai quali sono riconosciute proprietà antitumorali, antiossidanti, con benefici effetti sulle funzioni immunitarie, sulla riduzione del tasso di colesterolo, antidiabetogeno e promotori dei fattori di crescita. Lo stesso sistema di allevamento andrebbe inoltre ad incidere positivamente anche su un'altra categoria di acidi grassi polinsaturi e cioè sugli Omega3 a cui sono riconosciuti indubbe capacità di riduzione del rischio di insorgenza di malattie cardiovascolari.

La determinazione della composizione acidica del tessuto adiposo (sottocutaneo e perirenale) di 'Casertana', ha evidenziato una maggiore presenza della frazione insatura (acidi oleico e linoleico in particolare per circa il 63 % nel sottocutaneo e circa il 56 % nel

perirenale) rispetto a quella satura (acido palmitico e acido stearico per circa il 27 % nel sottocutaneo e circa il 36 % nel perirenale) in entrambi i tessuti.

Gli acidi oleico e linoleico sono tra i più importanti acidi grassi insaturi non solo dal punto di vista salutistico ma contribuiscono anche ad arricchire la componente aromatica.

### **Caratteristiche generali della carne suina**

La carne è costituita da tessuti connettivi e muscolari, e contiene dal 50% a circa l'80% di acqua, ma i valori nutrizionali sono fortemente variabili, a seconda del tipo di carne, del sesso, della razza e del tipo di allevamento dell'animale. In Italia oggi esiste la produzione di due diverse tipologie di suini:

- quello pesante, con più alto contenuto in lipidi destinato alla trasformazione (e per alcuni tipi è stata ottenuta anche l'autorizzazione di Indicazione Geografica Protetta);
- quello leggero, più magro, utilizzato per il consumo fresco.

Le razze ed i sistemi di allevamento sono diversi per i due tipi e sono diverse anche alcune caratteristiche sensoriali oltre che alcuni aspetti della composizione.

Nel prodotto finito destinato al consumo, la qualità si valuta prendendo in esame:

- la composizione chimica (e cioè il contenuto in sostanze nutritive);
- le caratteristiche sensoriali;
- le caratteristiche di sicurezza d'uso.

La carne suina, analogamente agli altri tipi di carne, è una buona fonte di proteine, ne contiene infatti circa 20 grammi per 100 g di carne e sono di alta qualità biologica. Le fibre muscolari della carne di maiale hanno struttura diversa dalla carne bovina che la rendono più tenera.

Come già detto in precedenza i rapporti tra i vari componenti variano a seconda di diversi fattori: specie, razza, sesso, età, tipo di alimentazione della bestia macellata. Nell'interno delle cellule che costituiscono i tessuti muscolari degli animali, oltre alle proteine, sono contenute anche le nucleoproteine, denominate "sostanze estrattive", che possono essere estratte dalla carne per mezzo dell'acqua bollente. Le sostanze estrattive azotate sono rappresentate da: creatina, (creatinina, xantina, urea, anserina, carnosina) e basi puriniche. Oltre che nelle cellule, le proteine sono presenti anche al di fuori di queste (proteine extracellulari) e sono costituite principalmente da collagene ed elastina. I lipidi, pur essendo presenti in quantità variabile, raggiungono mediamente il 3%, salvo rare eccezioni.

I glicidi e il glicogeno, sono rappresentati assai scarsamente (0,5%), ad eccezione che nella carne equina, in cui la quantità è maggiore. In ogni caso, nel tempo che trascorre tra la macellazione ed il consumo, i glicidi si trasformano in acido lattico. La carne è ricca di potassio e povera di sodio. Contiene molto fosforo e una discreta quantità di ferro e di

zinco. Il magnesio prevale sul calcio. Il suo contenuto in vitamine consiste soprattutto in tiamina, (vitamina B1) più alto che nella carne bovina, riboflavina (vitamina B2) , niacina (PP), piridossina (vitamina B6), acido pantotenico (vitamina D) e B12, anche questa più bassa che nella carne bovina e tracce di vitamina A e D. Tutte queste vitamine sono contenute in quantità maggiori nelle frattaglie e in particolare in fegato e rene. E' presente anche un buon contenuto in minerali come ferro, zinco, rame, selenio, presenti in una forma chimica ben utilizzabile. Il contenuto in mioglobina dipende dalla specie animale e dal tipo di taglio (cioè di tessuto muscolare): la carne suina ne contiene meno della carne bovina e pertanto presenta un colore più roseo. Il contenuto in ferro è comunque più basso che nella carne bovina. Il colore dipende dal contenuto in mioglobina, che è il pigmento presente nelle fibre muscolari che lega il ferro, e che va incontro a variazione di colore in relazione a processi di ossidazione. Il contenuto in lipidi totali varia molto a seconda del taglio, dal 3% nel coscio all'8% nella bistecca (considerando sempre il suino leggero) e varia anche molto in relazione alla "toielettatura" del taglio. Le caratteristiche sensoriali più rilevanti per quanto riguarda le carni fresche per il consumo diretto sono il colore, la perdita di liquidi e le infiltrazioni di grasso. La presenza di grassi all'interno del taglio si presenta come infiltrazioni, che danno luogo a venature, importanti ai fini del colore, ma soprattutto per la tenerezza ed il sapore. E' stato visto, infatti, che riducendo il contenuto in grassi al disotto del 2% la carne diventa dura e filacciosa e perde di sapore sia perché i grassi sono fattori fondamentali per quest'ultimo ma anche perché veicolano i composti responsabili del sapore. Anche la capacità di trattenere i liquidi è una caratteristica importante, sia della carne cruda che cotta, ed è un elemento positivo delle carni che dipende dalla struttura delle fibre muscolari. La sicurezza dipende dalla presenza di sostanze non desiderabili, nocive o tossiche che possono avere origine diversa. La presenza di queste sostanze può derivare anche da processi anomali di conservazione, cottura, trasformazione. Sul mercato la carne fresca è disponibile in una grande varietà di tagli (filetto, lombata, carrè, cosciotto, spalla, costine, stinco, pancetta) che hanno composizione e caratteristiche organolettiche diverse. Il consumo di carne di maiale non ha grandi conseguenze per la salute, soprattutto in relazione al contenuto in grassi e quindi alla digeribilità, grazie al cambiamento di composizione della carne. Anche il consumo di salumi, purché correttamente inserito nei consumi della giornata, non è in contrasto con le raccomandazioni nutrizionali. La carne vanta dunque un valore nutritivo di gran pregio, è

importante ricordare che includere nella dieta giornaliera una porzione di carne è estremamente utile per assicurarsi la copertura di buona parte delle necessità quotidiane in proteine, in certi minerali critici (quali ferro, zinco, ecc.) e in alcune vitamine del gruppo B, quali tiamina, niacina, riboflavina e vitamina B12. Per quanto riguarda l'apporto di energia, la carne, soprattutto in quelle varietà magre che oggi rappresentano la grande maggioranza dell'offerta, fornisce quantità limitate di calorie. Nella carne, come si è accennato, è presente una notevole quantità di proteine di alto valore biologico. Questo significa che le proteine della carne, in quanto proteine «animali», contengono in elevata quantità e in corrette proporzioni tutti gli aminoacidi (ossia i componenti di base che costituiscono le proteine) di cui l'organismo ha bisogno per le sue esigenze di costruzione e riparazione dei tessuti e per la sintesi di altre importantissime sostanze quali enzimi, anticorpi, ormoni, ecc. In particolare, nelle proteine della carne sono presenti notevoli quantità di aminoacidi «essenziali», ossia quegli aminoacidi che l'organismo non riesce a fabbricarsi da sé e che quindi deve obbligatoriamente ricevere dall'esterno, attraverso i cibi. Nella carne, quindi, non solo troviamo rilevanti quantità di proteine, ma anche proteine di elevata qualità. Per riassumere la composizione chimica della carne suina possiamo fare riferimento alla tabella riportata qui di seguito.

**Tabella relativa alla composizione chimica della carne suina**

Nutrienti	Unità	Valore per 100g	Numero di campioni	Errore std.
<b>Principali</b>				
Acqua	g	61.06	12	1.176
Calorie	kcal	263	0	
Calorie	kJ	1100	0	
Proteine	g	16.88	0	
Lipidi	g	21.19	12	1.549
Ceneri	g	0.87	1	
Carboidrati (per differenza)	g	0.00	0	
Fibre	g	0.0	0	
<b>Minerali</b>				
Calcio, Ca	mg	14	5	2.55
Ferro, Fe	mg	0.88	5	0.026
Magnesio, Mg	mg	19	5	0.771
Fosforo, P	mg	175	5	6.266
Potassio, K	mg	287	5	9.74
Sodio, Na	mg	56	5	0.553

Zinco, Zn	mg	2.20	5	0.067
Rame, Cu	mg	0.045	5	0.004
Manganese, Mn	mg	0.010	1	
Selenio, Se	mcg	24.6	5	4.548
<b>Vitamine</b>				
Vitamina C, acido ascorbico	mg	0.7	1	
Tiamina (B-1)	mg	0.732	1	
Riboflavina (B-2)	mg	0.235	1	
Niacina (B-3)	mg	4.338	1	
Acido pantotenico (B-5)	mg	0.668	1	
Vitamina B-6	mg	0.383	1	
Folati, totale	mcg	5	1	
Acido folico	mcg	0	0	
Folato, alimentare	mcg	5	1	
Folato, DFE	mcg_DFE	5	0	
Vitamina B-12	mcg	0.70	1	
Vitamina A, UI	UI	7	1	
Vitamina A, RAE	mcg_RAE	2	1	
Retinolo	mcg	2	1	
<b>Lipidi</b>				
Acidi grassi, saturi	g	7.870	0	
10:0	g	0.010	13	
12:0	g	0.020	13	
14:0	g	0.330	13	
16:0	g	4.770	13	
18:0	g	2.550	13	
Acidi grassi, monoinsaturi	g	9.440	0	
16:1 non differenziato	g	0.650	13	
18:1 non differenziato	g	8.500	13	
20:1	g	0.160	13	
Acidi grassi, polinsaturi	g	1.910	0	
18:2 non differenziato	g	1.670	13	
18:3 non differenziato	g	0.070	13	
20:4 non differenziato	g	0.080	13	
Colesterolo	mg	72	1	
<b>Aminoacidi</b>				
Triptofano	g	0.214	0	
Treonina	g	0.771	0	
Isoleucina	g	0.790	0	
Leucina	g	1.354	0	
Lisina	g	1.518	0	
Metionina	g	0.447	0	
Cistina	g	0.215	0	
Fenilalanina	g	0.674	0	
Tirosina	g	0.588	0	

---

Valina	g	0.916	0
Arginina	g	1.049	0
Istidina	g	0.674	0
Alanina	g	0.983	0
Acido aspartico	g	1.566	0
Acido glutammico	g	2.642	0
Glicina	g	0.802	0
Prolina	g	0.678	0
Serina	g	0.697	0

---

Ministero Americano dell'Agricoltura. 2007: "Database sulla composizione della carne suina".

### **Prodotti carnei di suino**

Una categoria estremamente importante di prodotti a base di carni suine è rappresentata dai salumi per i quali si ha in Italia una ricchezza di tipologie incredibilmente vasta, dai prodotti industriali a quelli di nicchia, dai prodotti che hanno ottenuto il riconoscimento di DOP (Denominazione di Origine Protetta) o di IGP (Indicazione Geografica Protetta) a quelli riconosciuti come prodotti tradizionali. Comprendono prodotti crudi o cotti, interi a pezzi o macinati e insaccati. La produzione di salumi è un'antica forma di conservazione e utilizzazione della carne suina. In passato tali prodotti erano legati al territorio sia per la tecnologia di preparazione, che per le modalità di maturazione, entrambe fortemente dipendenti dalla regione geografica. Un ruolo altrettanto determinante per la caratterizzazione e diversificazione dei salumi era la presenza sul territorio nazionale di vari tipi genetici di suini adatti a tale tipo di produzione. Con la riduzione e/o scomparsa di numerosi tipi genetici e l'abbandono dell'agricoltura, anche i prodotti tradizionali sono scomparsi dalla tavola del consumatore. Attraverso il recupero del germoplasma animale autoctono e delle tradizioni locali si può giungere a un recupero integrale e integrato dell'attuale agro-ecosistema fornendo nuovo impulso all'economia locale e allo sviluppo sostenibile, in armonia con una condizione ottimale di utilizzazione delle risorse autoctone. I Salumi, in questo contesto, rivestono un particolare interesse: essi sono fin dai tempi antichi un elemento tipico della nostra alimentazione con una grande ricchezza di "presentazioni" non solo regionali ma anche più strettamente territoriali. La composizione del prodotto di partenza, la carne suina, e' stata negli ultimi decenni sostanzialmente modificata sia mediante interventi genetici che di tecniche di allevamento, che hanno determinato una sostanziale variazione nel contenuto in grassi, il quale può variare nei diversi prodotti. Un aspetto da tenere presente è il contenuto in sale che spesso è alto (circa 5/6 grammi per 100 grammi di prodotto). Per quanto riguarda gli additivi è ammessa l'aggiunta di nitriti e nitrati che sono importanti come agenti antimicrobici (per evitare lo sviluppo del batterio botulino) ma anche come esaltanti del colore per i complessi che formano con la mioglobina. I suini richiesti dall'industria di trasformazione in genere, come già anticipato, debbono fornire una carne dotata di particolari caratteristiche di consistenza e maturazione: tali caratteristiche sono riscontrabili solo nei suini cosiddetti "pesanti" di età e di peso elevati. Sono così garantiti pezzi anatomici di un peso sufficiente per la lavorazione (tra i 10 e i 15 kg con ottimo tra 12 e 14 kg dopo la rifilatura) e l'ottima

copertura adiposa atta a preservare la succosità e la fragranza del prodotto finito. La carne matura ha un minor quantitativo di umidità, si conserva meglio, ha un colore rosso uniforme, una buona consistenza delle parti magre ed adipose. Nel caso delle carni del suino nero Casertano è importante sottolineare che si differenziano da quello Large White perché nel primo caso parliamo di maiale da lardo, detto lard type, le cui carni sono compatte, tenere, delicate e profumate, questo proprio grazie al fatto che gli esemplari di questa razza pregiata si alimentano a pascolo. L'abbondanza di tessuto adiposo non è molto gradita agli allevatori, i quali hanno preferito nel tempo quelle razze che davano più carne e meno grasso, come il Large White. Ma per fortuna che qualcuno ha continuato ad apprezzare la razza Casertana, rendendo possibile quel discorso di selezione genetica che oggi si avvia con il neonato consorzio. Tolto lo strato di lardo sottocutaneo, un'altra delizia che può competere col più celebrato lardo di «Colonnata», la carne è compatta, tenera e profumata. E se fino a oggi per trovare il maiale nero Casertano bisognava conoscere i piccoli allevatori che li tiravano su, più per passione che per motivi commerciali, con l'avvio dell'attività del consorzio si può finalmente sperare nella creazione di una vera e propria filiera che renda più accessibile al pubblico questa prelibatezza casertana, da cui, oltre alla carne, si ricavano salumi davvero speciali. E da carni di tale pregio non potevano che ricavarsi salumi di qualità eccelsa, tanto da venire paragonati a quelli di "Pata Negra": salsicce, soppressate, capicollini e prosciutti, i quali vengono sapientemente valorizzati dalla lavorazione, di stampo tradizionale. Di tutte queste prelibatezze, iniziamo con il Prosciutto Crudo di Pietraroja Stagionato, ricavato dalle carni dei suini delle razze tipo Pelatello Casertano, Landrace, Large White e loro incroci, nati, allevati e macellati nell'area geografica del comune di Pietraroja e dei comuni limitrofi. Rinomato da secoli, basti ricordare che già nel 1776, il Duca di Laurenzana di Piedimonte, si assicurava una fornitura cospicua di "Prigiotta" da Pietraroja per la sua mensa. Nel 1917, Antonio Iamario, nella sua descrizione della provincia di Benevento "Regina del Sannio", narrando di Pietraroja, scrisse: "Fiorente vi è principalmente l'allevamento dei suini, donde i rinomati prosciutti di Pietraroja". La lavorazione tipica del prosciutto "Prosutto" inizia con una "rifilatura a mano del coscio, il prosciutto si ottiene dalla coscia fresca posteriore del suino, con esclusione dei verri. Il giorno dopo lo "sfascio", viene messo sul timpano "timpagnu" di legno, a quattro piedi, concavo ed inclinato, ove avviene la "salatura" che dura 15/20 giorni "stannu 'nzale". Quando ha perduto buona parte della siosità "salamona", tra cui sangue

e acqua, viene ripulito del sale residuo e collocato nella pressa (torchio di legno) "supprescia" dove viene pressato per quattro giorni. La pressa è composta da quattro assi verticali montati su di una base e forate in vari punti, nelle quali scorrono pesanti tavole a comporre più piani "registri". Sul prosciutto scende la prima tavola e sui suoi angoli cubi di legno, fissati da "chiovoli" che attraversano i fori delle assi verticali. Nell'intercapedine tra tavola e cubo, ogni dodici ore, vengono spinti a martellate con cunei "zeppe" di sezione crescente. Dopo la pressatura, il prosciutto viene sospeso in un luogo fumoso per una settimana. Per quattro settimane subisce un'ulteriore pressione e poi speziato con pepe nero e peperoncino. Quest'ultima operazione non è una regola fissa. Infine viene agganciato ad una trave del soffitto in una stanza asciutta ed areata. Il prosciutto dalla forma classica e dal peso medio variabile dai 9 ai 13 Kg., ha un tipico colore rosso cupo. Il leggero strato di grasso, di colore bianco latte, che lo ricopre al di sotto della cotica, ne esalta le qualità organolettiche. Questo prosciutto viene sottoposto ad un lungo processo di stagionatura, che può durare fino a 4 anni, in locali tali da garantire un microclima con un'adeguata circolazione di aria ed una temperatura costante. Un altro prodotto è la Soppresata di Gioi, un paese in collina a circa 600 metri sul livello del mare, poco distante dalle zone litorali cilentane di Agropoli, Pollica, Casalvelino ed Ascea, è un salume particolare, di nicchia, prodotto in un ristretto comprensorio, quello comunale di Gioi Cilento, e dei paesi limitrofi di Cardile, Salento, Stio, Gorga, Orria e Piano Vetrale. È un prodotto antichissimo, con testimonianze scritte risalenti all'XI secolo, prodotto soltanto di inverno, nella stagione fredda. Si ottiene dalla lavorazione delle parti magre del maiale (filetto, coscia, lombo e spalla) accuratamente sminuzzata finemente a punta di coltello, condita con sale, pepe e, in certi casi, peperoncino e finocchietto. Questo impasto di carne si fa riposare per una decina di ore, per poi insaccarlo nel budello naturale, inserendo al centro un filetto di lardo lungo quanto il budello stesso. Segue la fase della stagionatura, a volte preceduta da una leggera affumicatura. La soppresata di Gioi è un salume dal colore rosso bruno e dal profumo molto aromatico. Un sapore incredibile, intenso al palato, da gustare con calma e da assaporare fino in fondo. Il lardello al centro di ogni fetta accentua l'aroma persistente della carne scevra da ogni nervetto e quindi particolarmente morbida. Le spezie rendono completo il gusto di un salume eccezionale. La tradizione locale vuole che sia conservato sotto sugna o sott'olio, ma oggi il prodotto viene conservato anche sotto vuoto. Per non dimenticare la Soppresata del Sannio, prodotto

trasformato della provincia di Benevento e lavorato ancora oggi artigianalmente. Le carni utilizzate sono esclusivamente magre, provenienti dal filetto, dalle spalle e dalle rifilature delle altre parti. Vengono tagliuzzate utilizzando il coltello o una macchina sminuzzatrice, che le riduce in pezzi detti "a chicco di mais" subito dopo salate e speziate con pepe nero in granuli. Vengono poi impastate con le mani e lasciate riposare per alcune ore in recipienti forati per permettere lo scolo delle acque. Infine le carni vengono insaccate nelle budella più larghe del maiale, preventivamente lavate ed aromatizzate per almeno 24 ore in una soluzione di acqua, sale e bucce di agrumi. L'insaccatura, compiuta a mano, si esegue pressando la carne in piccole quantità in un canovaccio e inserendola poi nelle budella, preventivamente chiuse ad una estremità con spago sottile di canapa. Durante l'operazione di insaccatura vengono inseriti piccoli cubetti di lardo dorsale che caratterizzano il prodotto per tipicità di sapore e morbidezza. I saccottini così ottenuti vengono chiusi anche all'altra estremità, forati con un grosso spillo su tutta la loro superficie, legati con spago longitudinalmente e trasversalmente, stringendo la legatura in modo che il contenuto venga ulteriormente pressato. Il prodotto viene appeso a pertiche di legno o di canne e fatto essiccare per 20 – 30 giorni. Al termine della fase di stagionatura la sopressata, liberata dallo spago, può essere conservata intera in recipienti di vetro o ceramica, interamente ricoperta da sugna fusa oppure da olio extravergine di oliva.

**Struttura Muscolare: generalità e caratteristiche**

L'apparato muscolare è il responsabile di tutti i movimenti di un organismo ed è il più cospicuo; nei vertebrati il suo peso rappresenta la metà di quello corporeo.

I muscoli in base alla loro azione possono essere suddivisi in:

- Volontari
- Involontari.

In base alla loro struttura sono indicati come:

- Striati
- Lisci

I muscoli involontari sono muscoli che si contraggono autonomamente e sono muscoli lisci. Questi sono molto più lenti dei muscoli volontari, ma rimangono contratti più a lungo. I muscoli volontari reagiscono ad un precomando; in altre parole, siamo noi a decidere cosa muovere. I muscoli volontari sono muscoli striati; fa eccezione il cuore, che è un muscolo striato ma involontario. Esistono tre tipi di fibre muscolari:

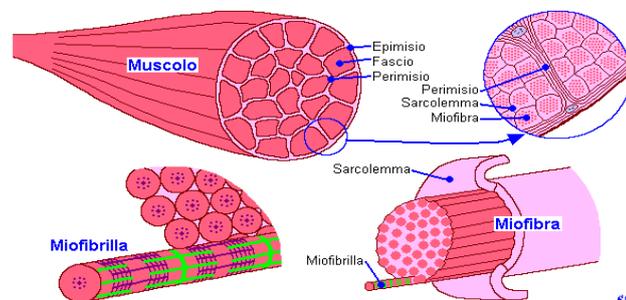
- Fibre muscolari lisce
- Fibre muscolari striate
- Fibre miocardiche

tutti e tre i tipi di fibre muscolari hanno le stesse proprietà fondamentali tra cui: eccitabilità, contrattilità, elasticità.

La differenza tra i muscoli (striati, lisci e miocardici) riguarda sia la morfologia del muscolo sia la loro funzione. Al microscopio si rileva che il muscolo, sia liscio che striato, è costituito da tante unità di fibre, ognuna delle quali è formata da fibrille più piccole dette miofibrille, immerse in una sostanza citoplasmatica. Le fibre sono riunite in fasci e sono rivestite da una sottile membrana semipermeabile, il sarcolemma. Le miofibrille delle fibre muscolari lisce sono apparentemente omogenee, mentre quelle dei muscoli striati presentano alternativamente zone distinte, dovute alla particolare disposizione delle due principali parti della miofibrilla: l'actina e la miosina. Oltre che per queste differenze strutturali i muscoli lisci e quelli striati differiscono per la loro origine, funzione e distribuzione nell'organismo. La muscolatura striata è la più altamente specializzata e si caratterizza per contrazioni rapide e potenti di singole fibre, mentre la muscolatura liscia, meno specializzata, ha contrazioni ritmiche e rilasciamento lento. Ogni muscolo contiene del tessuto fibroso bianco, o collagene; quando il collagene non è mescolato a fibre

muscolari da origine ai tendini. Questi ultimi possono trovarsi ad una o ad entrambe le estremità del muscolo o anche nella sua parte intermedia e possono prendere la forma nastriforme, cilindrica, triangolare, piatta e laminare.

La struttura muscolare scheletrica è molto complessa; l'intero muscolo è contornato da un tessuto connettivale detto epimisio. All'interno del muscolo stesso si trova un'organizzazione in fasci muscolari, ognuno dei quali è contornato da un tessuto connettivale detto perimisio. Dentro i fasci muscolari si trovano le cellule muscolari (fibre muscolari); dentro le cellule muscolari troviamo ovviamente tutte le componenti cellulari presenti in tutte le cellule ma in particolare modo le miofibrille: sono strutture cilindriche che attraversano l'intera fibra (cellula) che possono a loro volta essere divise in ulteriori unità dette sarcomeri. Il fenomeno della contrazione muscolare consisterà nell'accorciamento di questi sarcomeri, che provocheranno l'accorciamento delle miofibrille, delle fibre, dei fasci e infine del muscolo stesso (contrazione muscolare). Quindi possiamo dividere la struttura muscolare passando dal muscolo all'unità funzionale più piccola per cui avremo: muscolo -> fasci muscolari -> fibre muscolari -> miofibrille -> sarcomero.



**Tessuto muscolare: le fibre**

La fibra muscolare è l'unità morfologica del muscolo scheletrico o, più semplicemente, una delle tante cellule che lo compongono. Ogni muscolo è infatti formato da un certo numero di fascicoli, a loro volta costituiti da cellule chiamate, appunto, fibre muscolari. Grazie a queste unità cilindriche, l'energia chimica liberata dalle reazioni metaboliche si trasforma in energia meccanica che, agendo sulle leve ossee, realizza il movimento. Le fibre muscolari, raggruppate in fasci, hanno lunghezza variabile da pochi mm a diversi cm, con un diametro che va dai 10 ai 100  $\mu\text{m}$  ( $1 \mu\text{m} = 0.001 \text{ mm}$ ). Per questo motivo l'anatomia le descrive come lunghe cellule cilindriche, polinucleate, perché contengono numerosi nuclei in prossimità della loro superficie. Al loro interno si trovano invece migliaia di filamenti, detti miofibrille, contenenti unità contrattili chiamate sarcomeri. Le fibre muscolari scheletriche sono le più grandi cellule dell'organismo. Le fibre muscolari si differenziano principalmente in base a proprietà nervose, contrattili e metaboliche.

Proprietà nervose: si basano principalmente sulle caratteristiche dei motoneuroni, dalla soglia di eccitazione delle varie fibre e dal tempo di tetania muscolare.

Proprietà contrattili: rendono possibile la contrazione muscolare. Vengono quindi analizzate le proteine che costituiscono gli elementi contrattili in particolar modo la miosina (velocità di scissione ATP, dimensioni ecc.).

Proprietà metaboliche: rappresentano la quantità di enzimi e organelli presenti nel citoplasma oltre che il grado di vascolarizzazione/capillarizzazione.

Si possono individuare 3 tipologie di fibre muscolari ben distinte:

1. Fibre a contrazione rapida o dette anche Fibre rapide a metabolismo glicolitico ossidativo (Fast-twitch Glycolytic) FG.

Queste fibre sono dette bianche perché i muscoli in cui prevalgono si presentano più chiari rispetto a quelli prevalentemente "rossi", quindi sono poco vascolarizzati ma con elevate capacità contrattili. Presentano quindi scarsa mioglobina e capillarizzazione, oltre ad minor numero di mitocondri, mentre presentano abbondanti granuli di glicogeno. Le fibre bianche hanno inoltre maggior diametro e dimensioni maggiori delle rosse, come anche le loro giunzioni neuromuscolari. Si tratta di fibre caratterizzate da elevata attività ATPasica della miosina. Si contraggono rapidamente ed intensamente ma tollerano poco la fatica, quindi hanno una capacità elevatissima di imprimere elevati valori di forza in

brevissimi istanti. Presentano grandi quantità di enzimi glicolitici e producono prevalentemente ATP tramite la glicolisi anaerobica

Queste fibre si suddividono a loro volta in:

- Tipo A: sono fibre che possiamo definire "intermedie" presentando caratteristiche strutturali e metaboliche intermedie tra le 2B e le 1.
- Tipo B: sono quelle a più elevata attività glicolitica.
- Tipo X: sembrano essere ancora indifferenziate, dando poi origine alle 2A o 2B

2. Fibre a contrazione lenta o Fibre Lente a metabolismo Ossidativo (Slow-twitch Oxidative) SO.

Si presentano ricche di mitocondri, sia subsarcolemmali che intermiofibrillari, sono molto vascolarizzate, ma hanno scarse capacità contrattili infatti si contraggono lentamente e non producono una grossa quantità di forza ma hanno la capacità di produrre molta energia, anche se diluita nel tempo. Più sottili delle bianche, le fibre rosse trattengono più glicogeno e concentrano gli enzimi associati al metabolismo aerobico. I mitocondri sono più numerosi e di dimensioni maggiori, proprio come il numero di capillari che irrorano la singola fibra. La ridotta dimensione di quest'ultima facilita la diffusione dell'ossigeno dal sangue ai mitocondri, a causa della minor distanza che li separa. E' proprio l'abbondante contenuto di mioglobina e mitocondri a conferire a queste fibre il colorito rosso, da cui deriva il loro nome. La conduzione dello stimolo nervoso non è rapida come nel caso precedente, ma molto più continua e stabile nel tempo. I motoneuroni che le innervano sono infatti più piccoli rispetto a quelli che trasmettono l'impulso nervoso alle fibre veloci. Mentre i primi scaricano continuamente a basse frequenze, i secondi scaricano ripetutamente con salve a elevata frequenza. Hanno la caratteristica di avere una maggior quantità di alfa actinina e delle altre proteine a costituire linee Z ed un'"impalcatura" sarcomerica più abbondante. Presentano grandi quantità di enzimi mitocondriali e producono ATP prevalentemente tramite la glicolisi aerobica e la fosforilazione ossidativa ad essa associata.

3. Fibre intermedie o Fibre Rapide a metabolismo glicolitico ossidativo (Fast-twitch Glycolytic Oxidative) FOG.

Più ricche di mitocondri rispetto alle FG, sono mediamente meno rapide; sono più resistenti alla fatica e recuperano facilmente le riserve energetiche dopo un intenso esercizio. Queste fibre sono anche chiamate di tipo IIA, rosse come le SO o rosa.

Le fibre muscolari, quindi, in base alle loro capacità glicolitiche oppure ossidative influenzano le caratteristiche del muscolo post-mortem. Dopo la macellazione, infatti, il valore di pH decresce drasticamente e rapidamente raggiungendo un valore ultimo più basso nei muscoli chiari rispetto ai muscoli scuri in quanto i primi contengono più glicogeno e più enzimi glicolitici. I muscoli di suino con più fibre ossidative tollerano, inoltre, meglio le condizioni di stress durante il trasporto, risultando così un più lento abbassamento di pH dopo la macellazione.

### **Fattori di crescita: generalità e struttura della miostatina**

Gli organismi superiori sono composti da molti tipi di cellule diverse la cui crescita, sviluppo e funzione devono essere coordinati per il corretto funzionamento dei singoli tessuti e dell'intero organismo.

Ciò è possibile attraverso segnali cellulari specifici che controllano la crescita, lo sviluppo e la funzione dei tessuti.

Questi segnali molecolari stimolano una cascata di eventi nelle cellule, chiamata "segnalazione cellulare", che produce una risposta finale nella, o da parte della cellula.

Gli ormoni classici sono molecole di segnalazione ad ampio raggio (dette endocrine).

Queste sostanze sono prodotte e secrete dalle cellule o dai tessuti e messe in circolazione attraverso il sangue e altri fluidi del corpo per influenzare l'attività di altre cellule o altri tessuti del corpo.

Comunque, solitamente i fattori di crescita sono sintetizzati dalle cellule e influenzano la funzione cellulare della stessa cellula (autocrini) o di un'altra cellula vicina (paracrini).

Queste molecole sono i determinanti della differenziazione, della mobilità e dell'espressione genica cellulare e di come un gruppo di cellule agisce come tessuto ed organo.

La proliferazione, la crescita e lo sviluppo della maggior parte delle cellule richiede la combinazione specifica di più GF piuttosto che di un singolo GF.

Le sostanze che inibiscono la crescita possono controbilanciare le sostanze che favoriscono la crescita come in un sistema di scambio.

Normalmente i fattori di crescita (GF) sono efficaci in concentrazioni molto basse e hanno una forte affinità con i loro recettori corrispondenti sulle cellule interessate.

Per ogni tipo di GF c'è un recettore specifico nella membrana cellulare o nel nucleo.

Un GF può avere effetti biologici diversi a seconda del tipo di cellula con cui interagisce.

Alcuni GF stimolano la proliferazione cellulare mentre altri la inibiscono, altri ancora possono essere degli stimolanti quando presenti ad una determinata concentrazione ed essere inibitori ad una concentrazione differente.

In base alla loro funzione biologica, i GF rappresentano un'ampia schiera di proteine.

Solitamente sono raggruppati in base alla sequenza di amminoacidi e alla struttura terziaria.

Dei GF fa parte anche la "superfamiglia dei fattori di crescita trasformanti beta" (TGF- $\beta$ ) composta da numerosi sottotipi.

I TGF- $\beta$  sono secreti dalle cellule in forma complessa inattiva e fino a quando il complesso latente non è disgregato non svolgono attività biologica o comunque essa risulta minima; spesso la loro attività biologica si esprime in presenza di altri fattori di crescita.

Possiamo quindi capire che la bioattività dei TGF- $\beta$  è complessa, in quanto dipendono dallo stato fisiologico della cellula e da altri fattori di crescita.

La miostatina in particolare è un regolatore negativo della miogenesi, modula la proliferazione delle cellule precursori del muscolo ed ostacola la progressione dei mioblasti dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare.

Durante la miogenesi i mioblasti proliferano e si ritirano dal ciclo cellulare alla prima fase gap (G1) e successivamente seguono un percorso di differenziazione per formare i miotubi.

Lo sviluppo e la differenziazione dei mioblasti segue un meccanismo gerarchico:

MyoD e Myf-5: rivestono ruoli importanti per la definizione della linea muscolare che richiede la formazione di mioblasti

Miogenina: richiesta per la differenziazione dei mioblasti

MRF4: probabilmente coinvolti nella maturazione dei miotubi.

Oltre all'induzione di specifici geni muscolari c'è il ritiro dei mioblasti in proliferazione dal ciclo cellulare per diventare miotubi differenziati. La connessione tra il ritiro del mioblasto dal ciclo cellulare e la differenziazione è stabilita attraverso la regolazione dei CdKs (cyclin-dependent-kinase) una famiglia di enzimi che catalizzano gli eventi richiesti per le transizioni del ciclo cellulare. I target primari per questa regolazione sono i complessi G1 cyclin-CdK che includono: cyclin D-CdK4, cyclin E-CdK2 e cyclin D-CdK6, che cooperano per controllare la transizione G1/S attraverso la fosforilazione e l'inattivazione della proteina Retinoblastoma (Rb).

L'Rb è il maggior substrato dei complessi G1- Cdk, agisce legando e reprimendo l'attività di alcuni fattori di trascrizione, il più caratteristico dei quali è il complesso eteromero E2F-DP1. La fosforilazione dell'Rb mediante i Cdk rilascia l'E2F-DP1 da questa costrizione negativa, aiutando la trascrizione dei geni specifici della fase S (Rb iperfosforilato).

Al contrario, l'accumulo della forma ipofosforilata di Rb, attraverso l'inattivazione G1-Cdk, che si ottiene sia incrementando la concentrazione dei CKIs sia/o diminuendo la concentrazione proteica di Cdk, porterà al blocco delle cellule G1. Gli inibitori cyclin-dependent kinase (CKIs) di cui ci sono due famiglie, la famiglia p16 e quella p21, regolano le attività chinasi dei Cdk. La famiglia p16 in particolare, inibisce il Cdk4 e il Cdk6, mentre la famiglia p21 inibisce tutti i Cdk coinvolti nella transizione G1/S.

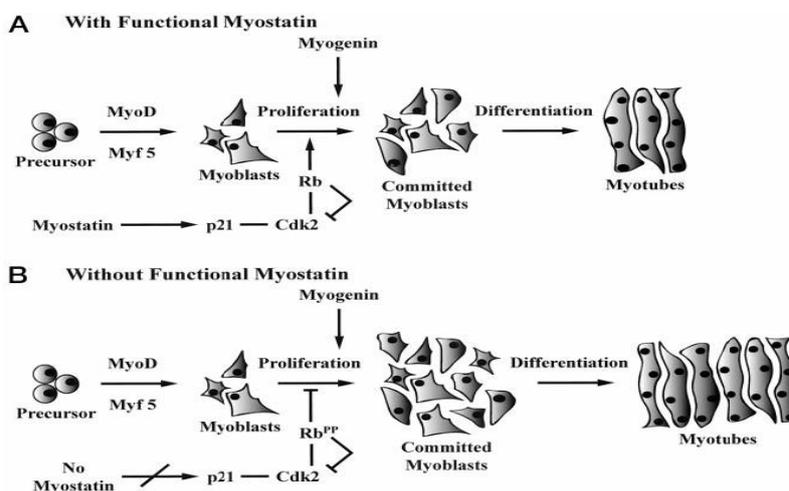
La miostatina regola la progressione del ciclo cellulare dei mioblasti controllando la transizione dalla fase G1 alla fase S e dalla fase G2 a quella M senza influenzare l'apoptosi dei mioblasti.

In particolare la proteina su-regolamenta il p21 e diminuisce i livelli e l'attività della proteina Cdk2 nei mioblasti. Inoltre nei mioblasti in presenza di miostatina la proteina Rb è preponderantemente presente nella forma ipofosforilata.

Quindi, in risposta al segnale della miostatina, c'è un incremento nell'espressione p21 e un decremento della proteina e dell'attività Cdk2 determinando così un accumulo della proteina Rb ipofosforilata e l'arresto dei mioblasti nella fase G del ciclo cellulare.

Così l'incrementato numero di miofibre visto nei bovini e nei topi con muscolatura pesante sembra essere il risultato della proliferazione del mioblasto deregolato causata dall'assenza della miostatina funzionale.

La capacità della miostatina di regolare la grandezza dei muscoli suggerisce che i



principali target per il segnale della miostatina negli animali adulti sono probabilmente le cellule satelliti. Le cellule satelliti, che sono cellule mono-nucleate localizzate tra il sarcolemma e la membrana basale delle fibre muscolari individuali, funzionano come una popolazione di cellule staminali all'interno del muscolo. Durante lo sviluppo della fibra muscolare le cellule satelliti normalmente quiescenti rientrano nel ciclo cellulare, proliferano e si fondono con le fibre muscolari esistenti. Il fatto che la perdita di miostatina possa causare taglie muscolari incrementate suggerisce che la miostatina possa normalmente agire per sopprimere la proliferazione/differenziazione delle cellule satelliti.

### **Esame della letteratura**

Il muscolo scheletrico è costituito da diversi tipi di fibre responsabili delle diverse prestazioni funzionali. Queste differenze si osservano anche quando si prendono in esame singole fibre all'interno di uno specifico muscolo. Tra tutte le proteine la più abbondante è la miosina sarcomerica che condiziona le performance meccaniche e il consumo energetico. L'alta eterogeneità funzionale è basata sulla presenza di diverse isoforme della catena pesante della miosina (MHC) espresse nelle diverse fibre muscolari scheletriche. Sono stati identificati i diversi geni che codificano le diverse isoforme dell'MHC di tipo 1 e tipo 2A, 2X e 2B (isoforme paraloghe) presenti nei muscoli scheletrici adulti. Quando si confrontano le corrispondenti isoforme tra diverse specie (isoforme ortologhe), si riscontrano scarse differenze ma sufficienti a conferire una diversa prestazione funzionale alla contrazione muscolare (Weiss A. et al., 2001). Oltre alle fibre denominate "pure", in quanto esprimono una singola isoforma della MHC, sono frequenti nel muscolo scheletrico adulto fibre denominate "ibride" (1/2A, 2A/X, 2X/B) in quanto coesprimono nella stessa fibra più di un'isoforma (Lefaucheur L. et al., 1998). Queste sono particolarmente numerose nei muscoli degli animali domestici. Negli ultimi anni, l'identificazione dei tipi di fibre è stata condotta con diverse metodiche: istochimiche basate sull'attività ATPasi-miosinica (m-ATPasi), immunostochimiche, elettroforetiche e più recentemente di biologia molecolare. Ogni metodo, se utilizzato singolarmente, presenta dei limiti nel classificare i tipi di MHC, specialmente quando si vuole confrontare le stesse isoforme in specie diverse. Recentemente, in numerosi lavori è stato dimostrato, con diversi approcci metodologici, che il suino è l'unica specie di grossa taglia in cui il gene della MHC di tipo 2B è attivato. Infatti l'isoforma di tipo 2B è espressa in alcuni muscoli scheletrici, dove è presente solo nelle fibre ibride di tipo 2X/B. Fibre pure di tipo 2B si riscontrano in diversi muscoli scheletrici. Le diverse isoforme della MHC sono state correlate con le proprietà funzionali quali la velocità di contrazione ( $V_0$ ) e la tensione isometrica ( $P_0$ ), misurate su singole fibre. Anche in questo caso, il suino è del tutto particolare in quanto i valori di  $V_0$  sono maggiori di quanto ci si possa aspettare sulla base della relazione con il peso corporeo. L'espressione della MHC di tipo 2B nel suino, a differenza di tutte le altre specie di interesse zootecnico, potrebbe essere correlata alla selezione sempre più spinta per la produzione di razze da carne. La muscolarità è legata al numero di fibre (iperplasia) e al loro diametro (ipertrofia). L'iperplasia è determinata da numerosi fattori di crescita durante

lo sviluppo fetale; alcuni di questi inducono la trasformazione di cellule non muscolari in mioblasti che, fondendosi, costituiscono i miotubi primari (MT 1°). Questi ultimi, vengono circondati da nuovi mioblasti che formano i MT secondari (MT 2°); con questi processi, alla nascita, viene determinato il numero finale di fibre tipico di ogni muscolo. Nel suino, dopo la nascita, si riscontra un'ulteriore crescita iperplastica al termine del 1° mese di vita per la comparsa dei MT di 3° generazione tra le fibre già differenziate. Durante queste fasi i MT e le fibre da esse derivate esprimono una isoforma della miosina di tipo transitorio (MHC di tipo embrionale e neonatale), sostituita poi dalla MHC di tipo adulto (Sun Y.M et al., 2003). Utilizzando mAb specifici per queste isoforme è possibile evidenziare i MT durante lo sviluppo. Il suino rappresenta un modello sperimentale particolarmente utile per studiare i fattori miogenici. Nei mammiferi, il differenziamento degli elementi precursori dei mioblasti in fibre muscolari avviene durante la vita fetale, mentre nel suino si può riscontrare anche al termine del primo mese di vita post-natale; i fattori che determinano questa iperplasia possono essere più facilmente studiati in questa fase. La miostatina (GDF-8), un membro dei transforming growth factors di tipo beta è espresso principalmente nel muscolo scheletrico, è uno dei fattori chiave per il differenziamento e la crescita del muscolo. I topi in cui il gene della miostatina è stato deletato, (knocked out) presentano masse muscolari 2 o 3 volte più grandi dei soggetti di controllo. Il fenotipo "doppia coscia" presente nei bovini di razze Belgian blue, Piemontese e Asturiana de los Valles è stato ricondotto a delezioni di alcuni nucleotidi, alla transizione o transversione nella regione codificante del gene della miostatina (Grobet L et al., 1997). Queste mutazioni compromettono l'azione biologica della proteina con conseguente aumento della muscolarità legata ad iperplasia. Ji et al. 1998 hanno condotto una ricerca sull'espressione della miostatina durante lo sviluppo e la crescita del muscolo scheletrico nel suino; hanno descritto una elevata espressione della miostatina al 49° e 105° giorno di gravidanza che coincide approssimativamente con la formazione dei MT 1°(45 gg) e MT 2° (75 gg); una diminuita espressione alla nascita fino alla 2° settimana di vita post-natale, e poi un progressivo aumento fino al raggiungimento di 55 Kg. Voelker et al. (comunicazione personale) hanno descritto nel suino di razza Yorkshire, ad elevata muscolarità, livelli più elevati d'espressione della miostatina rispetto alla Meishan una razza cinese a basso indice di crescita e che la regione codificante per la miostatina è identica nelle razze Meishans, Yorkshire, Duroc, Hampshire di suino. Questo risultato indica che l'espressione del GDF-8 nel suino non è strettamente correlata alla

minor crescita muscolare come dimostrato nel bovino e nel topo transgenico. Alcune ricerche attuali inducono a ritenere che la miostatina possa giocare un ruolo specifico anche nell'espressione del tipo di fibra. Il processo di miogenesi è inoltre controllato da una serie di fattori di crescita mioregolatori quali i Myogenic regulatory factors (MyoD, Myf5, miogenina e MRF-4) e i Myocyte enhancer factor 2 (MEF2). In vitro, questi fattori sono in grado di promuovere lo sviluppo muscolare di cellule non muscolari. Myf-5 e MyoD sono espressi nei mioblasti in coltura e continuano ad essere espressi dopo il differenziamento muscolare. La miogenina è espressa dopo la fusione dei mioblasti, mentre il fattore MRF4 è espresso solo dopo il differenziamento muscolare. Dati molto recenti suggeriscono che le cellule staminali pluripotenti (MPC) rappresentano, all'interno del muscolo, i progenitori delle cellule satelliti che vengono indotte dal fattore Pax 7. Le cellule satelliti vengono successivamente attivate in risposta a stimoli fisiologici, generando delle cellule precursori miogeniche (MPC) prima del differenziamento in miotubi. I promotori della crescita nel muscolo quali MyoD, IGF-I e myogenin sono associati con il differenziamento da cellule indifferenziate progenitrici in cellule muscolari e con l'espressione di geni specifici delle cellule muscolari. L'espressione del MRF-4 aumenta dopo la nascita ed è il fattore dominante nel muscolo adulto. Si ritiene che questo fattore possa giocare un ruolo importante nel mantenimento delle cellule muscolari.

Da un punto di vista più tradizionale la carne del suino è un'importante componente dell'alimentazione umana e numerose studi sono stati condotti per esaminare la correlazione tra qualità della carne (valutata sulla base del contenuto in proteine, grasso, ceneri e ritenzione di acqua) con la composizione in tipi di fibre. Tuttora vengono considerati come parametri principali di valutazione della qualità, il peso della carcassa e la percentuale di parte magra, anche se sono poco attendibili per indicare le caratteristiche qualitative dei singoli tagli di carne (Rossi, A. et al., 2001). Un interessante linea da sviluppare è lo studio che correla la composizione chimica di ogni singolo taglio di carne con i parametri di qualità più ampi, quale l'attitudine della coscia fresca ad essere stagionata che condiziona il valore economico finale del prodotto trasformato. Questi parametri comprendono: il peso della coscia e la globosità (intesa come circonferenza della coscia) è condizionata dalla muscolarità; nell'ambito di ciascun taglio la proporzione tra ossa, carne magra e grasso; infine la valutazione della crescita iperplastica e/o ipertrofica nel determinare la muscolarità di ciascun muscolo che, in ultima analisi,

costituisce un taglio commerciale di carne. E' ragionevole pensare che molti di questi parametri sono influenzati (o parzialmente influenzati) dalla composizione chimica del suino nel suo complesso che è una risultanza del suo genotipo, alimentazione ed ambiente. La correlazione tra crescita iperplastica e ipertrofica e la composizione chimica nei diversi tagli di carne sono le nuove linee che devono indirizzare la selezione genetica di linee differenziate per le finalità dell'industria di trasformazione.

## ***Parte Sperimentale***

### **Materiali e metodi**

Lo studio è stato condotto su campioni di muscolo quali il Semimembranoso (Sm), Semitendinoso (St), Bicipite Femorale (Bf), Quadricipite Femorale (Qf), Longissimus dorsi (Ld), Massetere (M), Diaframma (D), e Retrattore del Bulbo (RB) prelevati da suini di razza autoctona Casertana e commerciale Large White nati in vari allevamenti siti in Provincia di Benevento e Caserta, allevati e alimentati allo stesso modo, e sacrificati presso il macello di Morcone (BN).

I campioni di tessuto muscolare sono stati prelevati da **50** animali di razza Casertana e **80** di razza Large White rispettivamente da 0 a 120 giorni dalla nascita e precisamente a 0 - 30 -45 - 60 - 90 e 120gg.

Circa 45' dopo la macellazione, da ciascuno dei muscoli sopra citati, sono stati prelevati i muscoli oggetto di studio per l'esecuzione delle analisi.

### **Dieta**

I suini pesavano alla nascita rispettivamente:  $1.100 \pm 100$  Kg (Large White) e  $900 \pm 100$  Kg (Casertana). L'allattamento è durato circa 30 giorni ma dalla seconda settimana di vita sono stati anche alimentati, in quanto il latte materno non era sufficiente. Quindi sono stati aggiunti mangimi appetibili e digeribili, i cosiddetti alimenti pre-starter di alto valore nutritivo e biologico: farina di latte, farina di pesce, siero di latte, carrube, destrosio, olio di cocco, di palma, amminoacidi essenziali, sali minerali, rame, zinco e calcio. Al peso di circa 10-12 kg si è passati alla somministrazione di miscele starter fino al raggiungimento di 25-35 Kg. Da 35 a 120 Kg circa i suini, oggetto di studio, sono stati alimentati seguendo la dieta descritta in tabella:

<b>Dieta</b>	<b>Ingredienti (%)</b>
<b>Grano</b>	<b>40.15</b>
<b>Orzo</b>	<b>30.58</b>
<b>Farina di Soia</b>	<b>25.29</b>
<b>Olio di Canola</b>	<b>1.00</b>
<b>Mineral premix <sup>1</sup></b>	<b>0.50</b>
<b>Vitamina premix <sup>2</sup></b>	<b>0.50</b>
<b>Fosfato bicalcico</b>	<b>0.52</b>
<b>Sale</b>	
1: Forniti per Kg di dieta: Zn, 100mg; Fe, 80mg; Mn, 25mg; Cu, 50mg; I, 0.50mg; Se, 0.10mg;	
2: Vitamina A e D.	

### **Tipizzazione istochimica**

Sezioni trasversali dei campioni congelati, di circa 8 $\mu$ m di spessore, sono state tagliate al criostato e successivamente tipizzate utilizzando tecniche istochimiche.

La tipizzazione eseguita ha permesso di rilevare l'attività ATPasica miofibrillare (indice del tipo di contrazione rapida o lenta) e Succinico deidrogenasica (indice del tipo di metabolismo: glicolitico o ossidativo) sulla stessa fibra (Padykula e Herman, 1995; Nachlas *et al.*, 1957; Barany *et al.*, 1967; Edstom e Kugelberg 1968; Guth e Samara 1970; Solomon *et al.*, 1998; Velotto *et al.*, 2007).

La tecnica istochimica utilizzata per la colorazione delle fibre, detta combinata, consta di diverse fasi. La fase iniziale prevede una preincubazione acida, con una soluzione a pH 4.35 per un tempo pari a 20' a temperatura ambiente. La soluzione è costituita da 10 ml di cloruro di calcio 0.18 M, 0.3 ml di acido acetico, 0.485 g di acetato di potassio, 90 ml di acqua distillata.

Tale reazione si basa sulla presenza nel muscolo scheletrico dei mammiferi, di due tipi di ATPasi miofibrillare, qualitativamente differenti, con due pH ottimali di reazione, uno acido ed uno alcalino. La pre-incubazione acida ha la funzione di inattivare l'ATPasi delle fibre FG e FOG in quanto acido labile, indice di contrazione rapida. In tale condizione, l'ATPasi delle fibre SO risulta attiva per la stabilità a pH acidi di tali fibre, indice di una contrazione lenta. Successivamente si esegue un risciacquo in una soluzione tampone a pH 7.8, costituita da 10 ml di cloruro di calcio, 1,21 g di triidrossimetilaminometano, 90 ml di acqua distillata.

A questo punto si evidenzia il tipo di metabolismo attraverso la reazione con la succinicodeidrogenasi (20' a 37°C) costituita da 25 ml di tampone fosfato 0.2 M, 0.005 g di NBT (nitroblutetrazolo) in 50 ml di acqua distillata.

L'attività succinicodeidrogenasica risulta diversa per i tre tipi di fibra:

- quasi assente nelle fibre di tipo **FG**;
- accentuata nelle fibre di tipo **SO**;
- intermedia nelle **FOG**.

La fase successiva è l'incubazione in una soluzione a pH 9.4 per 50' a 37°C, costituita da 6.7 ml di sigma 221, 10 ml di cloruro di calcio 0.18 M, 0.370 g di cloruro di potassio, 0.152 ATP-disodium, 80 ml di acqua distillata.

Questa soluzione rappresenta il substrato specifico dell'enzima ATPasi, localizzato nella testa della miosina, attivato dagli ioni calcio e inibito dagli ioni magnesio.

L'attività dell'ATPasi viene evidenziata con la formazione di fosfato inorganico, il quale, in presenza di ioni calcio, forniti dall'incubazione successiva effettuata mediante tre lavaggi di 30" ciascuno in una soluzione costituita da 1 g di cloruro di calcio in 100 ml di acqua distillata, forma il fosfato di calcio che è insolubile e incolore; attraverso un'ulteriore incubazione per 3' in una soluzione contenente 2 g di cloruro di cobalto in 100 ml di acqua distillata, si forma fosfato di cobalto.

In seguito si effettuano 4 lavaggi, di 30" ciascuno, con una soluzione a pH 9.4 (pH ottimale per l'ATPasi) costituita da 6.7 ml di Sigma 221 in 100 ml di acqua distillata.

L'ultima fase consiste nel trattamento rapido con una soluzione contenente 1 ml di solfuro di ammonio per circa 30', che determina la formazione di un precipitato nero di solfuro di cobalto, il quale si localizza sui siti cellulari che contengono l'enzima ATPasi, evidenziandolo.

Al termine della colorazione le fibre FG (IIb) appariranno di colore chiaro per l'assenza dell'attività succinicodeidrogenasica e la presenza di quella ATPasica, quelle di tipo SO (I) saranno di colore scuro per la presenza sia dell'una che dell'altra attività biochimica, infine quelle di tipo FOG (IIa) avranno una colorazione intermedia alle precedenti, essendo dotate di intensa attività succinicodeidrogenasica e parziale attività ATPasica.

Le proprietà contrattili di ciascuna fibra sono state determinate misurando la tensione isometrica ( $P_o$ ) durante l'attivazione massima ( $pCA = 4.6$ ), la velocità di accorciamento ( $V_o$ ) seguendo la procedura dello "slack test" (Edman 1979). Tutti gli esperimenti sono stati condotti a 12°C. La caratterizzazione delle fibre si è ottenuta utilizzando le isoforme di miosina come marcatori molecolari.

Le fibre sono state sezionate manualmente allo stereomicroscopio (ingrandimento 10-60x). Al termine della dissezione, le fibre sono state trattate per 1h in una soluzione contenente l'1% Triton X-100 per garantire la completa solubilizzazione della membrana. Successivamente sono stati ricavati alcuni segmenti rappresentativi dalle fibre in esame, della lunghezza di 1-2 mm e sono state applicate clip di alluminio leggero a entrambe le estremità. Sono state preparate tutte le soluzioni necessarie per l'attivazione, la pre attivazione e il rilassamento per gli esperimenti meccanici con le fibre seguendo la

procedura di Pellegrino *et al.*, 2003. Sono stati aggiunti a tutte le soluzioni inibitori di proteasi (E64  $\mu\text{mol l}^{-1}$  e leupeptina  $40 \mu\text{mol l}^{-1}$ ). Una volta che la clip è stata applicata, il segmento di fibra è stato montato nel set-up sperimentale in una goccia di soluzione di distensione tra il trasduttore (AME-801 SensorOne) e l'estrattore elettromagnetico (SI, Heideberg, Germania) dotato di un trasduttore di spostamento. Il diametro e la lunghezza del sarcomero sono stati misurati al 320X di ingrandimento.

Per calcolare la percentuale delle fibre sono state analizzate circa 200 fibre, derivanti da un numero di campi casuali compresi tra otto e dieci. Tutti i dati sono stati analizzati mediante test T di student per la valutazione dei campioni appaiati, utilizzando il programma SAS e assumendo  $P < 0.001$  e  $P < 0.0001$  per significatività statistica.

### **Tipizzazione immunoistochimica MHC**

Sezioni trasversali, di tutti i muscoli oggetto di studio, di circa  $5 \mu\text{m}$  di spessore, sono state tagliate al microtomo e successivamente tipizzate utilizzando tecniche immunoistochimiche.

Le sezioni sono state tipizzate con i seguenti anticorpi monoclonali: A.4.74, BF35, S5-8H2, specifici per le differenti isoforme di miosina (**Tab. 1**). Gli anticorpi utilizzati sono stati precedentemente caratterizzati in muscoli di topo.

Per la localizzazione di anticorpi primari è stato utilizzato il complesso avidina-biotina perossidasi (ABC). E' stato usato inoltre un tampone fosfato per tutte le classi di anticorpi primari IgG e Tris (TBS) e per tutte le classi di anticorpi primari IgM.

Sezioni di tessuto sono state riscaldate a temperatura ambiente per 10-20 minuti e quindi reidratate con una soluzione tampone (PBS o TBS) per 10-20 min. Successivamente i campioni sono stati pre-incubati in una soluzione di bloccaggio all'1.6% e quindi è stata rimossa la soluzione in eccesso.

E' stato inoculato l'anticorpo primario cui è seguita un'incubazione overnight in camera umida a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Le sezioni sono state lavate in una soluzione tampone per 10 min e quindi è stato inoculato un secondo anticorpo, per 60 min a temperatura ambiente.

E' stato effettuato un risciacquo delle sezioni con una soluzione tampone per 10 min e quindi una reazione con ABC per 60 min a temperatura ambiente.

Per localizzare la perossidasi in tutte le classi di anticorpi primari IgG come cromogeno è stato utilizzato DAB (3,3'-diaminobenzidine) (3-6 min a temperatura ambiente), mentre per rilevare la reazione in tutte le classi di anticorpi primari IgM è stata usata poi una soluzione BCIP/NBT.

Ogni vetrino è stato montato, con una goccia di EUKIT (collante istologico) con un vetrino copri oggetto.

<b>Tab. 1</b> Specificità degli anticorpi monoclonali (Mabs) contro le isoforme a catena pesante di miosina del muscolo scheletrico di topo adulto				
<b>Mabs</b>	<b>I</b>	<b>Ila</b>	<b>Ilx</b>	<b>Ilb</b>
A.4.74	-	+	+/-	-
S5-8H2	-	+	-	+/-
BF-35	+	+	-	+

### **Studio elettroforetico delle isoforme dell'MHC**

Per la separazione elettroforetica delle isoforme della miosina sono stati utilizzati i muscoli oggetto di studio per entrambe le razze.

Per l'estrazione delle proteine dai muscoli è stata utilizzata la seguente procedura:

- 1gr in 6 ml di buffer di estrazione;
- 20mM Tris HCL pH 7.5;
- 5mM EDTA;
- 0,1% MCE.
- A tale buffer sono stati aggiunti gli inibitori delle proteasi:
- 1mM PMSF (inibitore serin proteasi);
- 100 mg/L inibitore tripsina.

È stata effettuata un'omogeneizzazione con il Polytron e sono stati lasciati 30 minuti in ghiaccio e in seguito una centrifugata a 25 mila giri per 30min a 4°C. Il surnatante è stato ulteriormente centrifugato a 14000 rpm per 10 min a 4°C.

Per determinare la concentrazione delle proteine nei campioni, è stato utilizzato il

metodo Bradford.

La proteine sono state poste nel loading buffer 1X (30mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 300mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 20% glicerolo, 0,1% blu bromo fenolo) sono stati riscaldati a 100°C per 3 min. Terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato posto nell'apparato di trasferimento insieme alla membrana di nitrocellulosa per 1,30 ore a 4°C nel transfer buffer (40mM glicina, 50mM Tris base, 37% SDS, 20% metanolo) utilizzando un voltaggio di 100V.

La membrana di nitrocellulosa è stata successivamente immersa nella Blocking solution (20mM Tris Base, 150mM NaCl, 0,5%, 1% no fat dry milk) a 37° per 30 minuti. Tale passaggio consente il blocco dei siti aspecifici per le immunoglobuline.

In seguito la membrana è stata incubata overnight a temperatura ambiente con gli anticorpi primari diluiti 1:1000. Dopo l'incubazione sono stati effettuati diversi sciacqui con il TBS per eliminare l'eccesso di anticorpo e quindi evitare un alto background.

In seguito è avvenuta l'incubazione con l'anticorpo secondario coniugato alla perossidasi equina (IgG anti-mouse HRP) diluito 1:5000. L'incubazione è avvenuta per 1 ora a temperatura ambiente.

Dopo l'incubazione sono stati effettuati diversi sciacqui con il TBS ed è stata possibile la rivelazione chemiluminescente. La determinazione chemiluminescente usa un enzima per catalizzare una reazione che risulta nella generazione di luce visibile.

### ***Quantificazione delle isoforme delle MHC ottenute mediante l'analisi elettroforetica***

#### ***Studio di espressione quali e quantitativa del gene per l'isoforma di tipo 2B***

##### **Preparazione di cDNA e RT-PCR**

Campioni di RNA sono stati estratti dai muscoli dei suini con TRIZOL reattivo (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, UK). I primi strand di cDNA sono stati sintetizzati con esameri random utilizzando apice trascrittasi inversa RNasi H-(GibcoBRL, Life Technologies) dalla stessa quantità di RNA totale (1,5 mg). Le reazioni di PCR qualitativa sono state standardizzate per ogni singola isoforma (numeri di ciclo di ricottura e temperatura di allineamento). Sono state utilizzate le seguenti condizioni ottimizzate per la PCR (27 cicli di 45s a 94 °C, 45s a 55 °C e 45s a 72 °C) per le isoforme di MHC. Sono stati progettati primer forward dalle regioni di codifica (sequenze disponibili su Gene -

Bank, i numeri di adesione: MHC-2A, AB025260; MHC-2B, AB025261; MHC-2X, AB025262; MHC-1, AB053226). I primer Reverse sono stati progettati nelle regioni 3 non codificanti (UTRs), che sono state sequenziate. La sequenza di 3'UTR di MHC-1 è disponibile su Gene - Bank (numero di adesione, AB053226), le sequenze del 3'UTR delle isoforme veloci sono state messe a nostra disposizione dalla Facoltà di Scienze dell'Università del Sannio.

#### **Primers usati per RT-PCR delle isoforme di miosina**

<b>MHC-2A</b>	for 5'AGCCGGGAGGTTACACAAA3' rev 5'CTTTGCAATAGGGTAGGATAGGC3'
<b>MHC-2B</b>	for 5'TGAAAATGAACAGAAGCGCAATG3' rev 5'TTTCCTTGACATCACATGACATATAAC3'
<b>MHC-2X</b>	for 5'TGAAGAAGAACCTGGAGCAGACG3' rev 5'CATTAAGTACAAAACAGAGTGACAAAGATT3'
<b>MHC-I</b>	for 5'TGGAGCGCATGAAGAAGAACA3' rev 5'AGTGCTTTATTCTGCTTCCTCAA3'

for, forward; rev, reverse.

Tutte le PCR sono state eseguite in 20 microlitri di mix di PCR: 1x tampone PCR (Gibco, BRL), 1.8mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.1mmol l<sup>-1</sup> di ogni dNTP, 0,5micromol l<sup>-1</sup> di ciascun primer, 0,5 U di Taq DNA polimerasi e 1 microlitri del DNA. I prodotti della PCR sono stati sottoposti a elettroforesi su un gel di agarosio 1,8%, con bromuro di etidio e visualizzati sotto luce UV.

#### **Tipizzazione immunoistochimica: gene Pax 7**

Sezioni trasversali, di tutti i muscoli oggetto di studio, di circa 8µm di spessore, sono state ottenute al criostato e successivamente tipizzate utilizzando tecniche immunoistochimiche (Toniolo *et al.*, 2004).

L'anticorpo monoclonale anti-Pax7 (Mab 1675 R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) è stato usato a 10 µg/ml.

L'anticorpo mstn (GDF8-BL89; Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX) è stato usato come in Matsakas *et al.*, (2006). La laminina anti-topo coniglio (AB2034; Chemicon Int., Milano, Italia) è stata usata ad una diluizione di 1:80 in accordo con il protocollo di manifattura.

L'anticorpo monoclonale BA-F8 (anti-lento), che è stato acquistato dalla DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany), è stato usato come descritto da Toniolo *et al.*, (2004). L'anticorpo monoclonale anti-miogenina (MAB 3876) della Chemicon Int. (USA) è stato utilizzato a 1 µg/ml. L'anticorpo policlonale anti-MyoD (M-318) della Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA) è stato utilizzato diluito 1:100. La catena pesante di miosina (MHC) policlonale antineonatale è stata usata come descritto in Scapolo *et al.*, (1991). Gli anticorpi secondari utilizzati sono stati anti-capra o anti-coniglio e/o topi coniugati con fluoresceina (FITC, Vector Labs., Milano, Italia) e anti-topo accoppiato con Texas Red (Vector Labs., Milano, Italia) diluito di 1:200, mentre la colorazione nucleare è stata eseguita con TO-PRO®-3 ioduro di propidio acquistato dalle Sonde Molecolari (Invitrogen, Milano, Italia). Tutti gli anticorpi sono stati diluiti in PBS. Le immagini sono state ottenute con un microscopio confocale a scansione laser (CLSM) del tipo Leica TCS-SP2. I controlli per la specificità dell'anticorpo hanno incluso immunocolorazione omettendo gli anticorpi primari, colorazione sia con ciascuno degli anticorpi primari che con entrambi gli anticorpi secondari, colorazione con ciascuno degli anticorpi primari seguiti dal reciproco anticorpo secondario e colorazione con gli anticorpi primari accoppiati seguiti da ciascuno degli anticorpi secondari.

### ***Ibridazione in situ su tessuto muscolare congelato***

Sezioni congelate di muscoli scheletrici pre e post- natali sono state trasformate per esperimenti di ibridazione *in situ* come descritto precedentemente (Eizema *et al.*, 2003). Brevemente, il plasmide cDNA linearizzato della miostatina di suino è stato usato come modello per generare sonde RNA senso e antisense attraverso l'impiego del batteriofago SP6 o con la polimerasi T7 RNA (Roche, Indianapolis, IN). L'RNA è stato ricostituito in 50 µl di TE e 5 µl sono stati trasferiti su agarosio all'1% / gel TBE per valutare la sua qualità e concentrazione. Le ribo-sonde (500 ng/ml di concentrazione finale) sono state risospese

nella seguente soluzione, tampone di ibridazione: 50% di Formammide (deionizzata), 1x SSC (Tampone salino di citrato di sodio), 10% di destrano solfato, soluzione 1 x Denhardt, NaCl 0,67M, 0,1 µg/µl di tRNA di lievito e 0,1 µg/µl di DNA di sperma di aringa.

L'ibridazione è stata eseguita per tutta la notte a 50°C in un incubatore umidificato. Le sonde ibridizzate sono state rilevate con l'anticorpo anti-digossigenina coniugato con FITC (Roche). Le immagini sono state ottenute con un Leica TCS-SP2 CLSM. Le sonde senso sono state usate come controlli negativi in tutti gli esperimenti.

### ***Espressione dei fattori appartenenti alle superfamiglie delle IGF e dei TGF - beta***

#### ***Espressione della miostatina in animali ad alta e bassa muscolarità***

Prelievo di campioni di muscoli suino, RT-PCR

I campioni sono stati ottenuti dai muscoli di suini oggetto di studio a diversi stadi di sviluppo post-natale (0 -120 giorni dopo la nascita). I campioni per l'estrazione di RNA sono stati stoccati in RNA-later reagente (Ambion) fino al momento dell'utilizzo. L'RNA totale è stato estratto da circa 100 mg dei diversi tessuti muscoli usando il reagente Trizol (Invitrogen) e quantificato mediante uno spettrofotometro (Pharmacia). 1,2 mg di Total RNA è stato trattato con RT kit II (Invitrogen). I cDNA ottenuti sono stati utilizzati come campioni per l'espressione dell'analisi di RT-PCR. Sono state eseguite diverse reazioni di PCR, utilizzando primer specifici di suino (individuati su sequenze nucleotidiche presenti in Gene - Bank: **MyoD**, U12574, **Myf5**, Y17154; **Myogenin**, U14331; **miostatina**, AY448008), oltre al gene **Pax7**. Quest'ultimo è stato amplificato utilizzando primer degenerati basati su sequenze di mammiferi (umani e topi). Tutte le PCR sono state eseguite in 20 microlitri di mix di PCR: 1X PCR buffer (Invitrogen), 1.8mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM di ciascun dNTP, 0,5mM di ciascun primer, 0,5 U di Taq DNA Polimerasi e 2 microlitri del DNA. Per valutare la buona qualità di RNA e l'efficienza della reazione di RT, è stato amplificato un frammento di il cDNA suina  $\alpha$ -actina. I prodotti della PCR sono stati sottoposti a elettroforesi su un gel di agarosio 1,8%, colorato con bromuro di etidio e visualizzati sotto luce UV. Il prodotto PCR della Pax7 è stato clonato nel II-PCR utilizzando un vettore plasmidico di clonazione TOPO-TA kit (Invitrogen) e sequenziato. La sequenza (Gene - Bank adesione numero: AY653213) è stato allineata con il software DIALIGN.

Successivamente, Pax7 oligonucleotidi specifici sono stati progettati per amplificare un prodotto di 100bp in una PCR qualitativa.

**Primers usati nella RT-PCR. Ta = Annealing temperature. Pax7 deg.p. = degenerate primers. Pax 7 s.p. = specific primers**

Gene	Ta (°C)	Primer (5'-3')	Forward Reverse Primer (5'-3')	PCR Cycles
Myf5	52	TGGAAATCAGTTATAGGGAGTT	TTTGTGCTTACATTA AAAAGATGC	35
MyoD	52	T	AGTATGCAAGGGTGGAGTGG	35
Myost.	55	TGCGTATTCTCAACCCCTTC	CATGGCTGGAATTTTCCC	30
Pax7 deg. p.	57	GAAGTCAAGGTGACAGACACAC GTCAATCA(AG)CT(GCT)GG(AT)	CGGAT(CT)TCCCAGCTGAACAT(G C)CC	30
Pax 7 s.p.	55	G G(AG)GT(CT)TTCAT CAACCACATCCGCCACAA	TCTTGGAGACACAGCCATGG	30

## **Risultati e Discussioni**

### **Istochimica**

Dalla tipizzazione istochimica si è potuto rilevare come in entrambe le razze, nei muscoli oggetto di studio, tra 0 e 15gg di post - natale non vi era una netta distinzione tra le fibre muscolari come osservato da Bee G. 2004 infatti, lo stesso autore conferma che solo entro i primi 20gg di età le fibre muscolari iniziano la loro differenziazione in tipo ossidativo, ossidativo-glicolitico e glicolitico (**Fig. 1-4**).

Nel nostro caso solo dopo i primi 30gg di vita gli animali presentavano i tre tipi di fibre distinte per colore in: scure, chiare, intermedie, anche se non con una netta definizione di colore.

Queste osservazioni dimostrano che i periodi prenatale e post-natale influenzano il rapporto delle fibre primarie e secondarie e di conseguenza, il metabolismo e lo sviluppo della contrazione delle miofibre.

Le suddette fibre scure, chiare e intermedie, non ancora ben definite a 30gg di vita degli animali, dovrebbero successivamente coincidere con le fibre SO (fibre lente a metabolismo ossidativo), FG (fibre rapide a metabolismo glicolitico) e FOG (fibre rapide a metabolismo glicolitico-ossidativo) che negli animali adulti normalmente sono presenti come osservato dal lavoro di Velotto *et al.* 2007 e Velotto *et al.* 2010 (**foto 9 - 12**).

La coesistenza dei tre tipi di fibra, a 45gg di vita dell'animale, potrebbe essere dovuta al fatto che i muscoli, per essere versatili, devono essere formati da diversi tipi di fibre con differente velocità di contrazione. Grazie alla suddetta tipizzazione si è potuto osservare che nelle 2 razze oggetto di studio e nei muscoli considerati i tre tipi di fibre hanno mostrato un comportamento simile per ciò che riguarda l'attività enzimatica, inoltre le fibre SO, come già osservato in molti lavori, vanno già a formare dopo i 30gg delle forme particolari note come "forme a rosetta" (**Fig. 5 - 8**).

Per quanto concerne la distribuzione percentuale dei tipi di fibra, a **60gg** di vita invece (**Tab. 2**), i risultati riportati rivelano come nei muscoli studiati sia presente una percentuale di fibre scure più alta rispetto sia alle fibre intermedie sia a quelle chiare, nonostante la differenziazione in atto.

Tabella 2	%			Razza
	SO	FOG	FG	
Semimembranoso	41	36	23	Casertana
	40	32	28	Large White
Semitendinoso	35	35	30	Casertana
	34	37	29	Large White
Bicipite Femorale	38	32	30	Casertana
	37	33	30	Large White
Quadricipite Femorale	35	33	32	Casertana
	34	34	32	Large White
Longissimus Dorsi	39	33	28	Casertana
	38	37	25	Large White
Diaframma	38	32	30	Casertana
	37	33	30	Large White
Massetere	36	35	29	Casertana
	35	35	30	Large White
Retratto del Bulbo	40	32	28	Casertana
	39	38	23	Large White

Le fibre FG, dette anche fibre bianche, ricavano la loro energia anaerobicamente dal glicogeno, sono in grado di contrarsi molto rapidamente e per tale motivo entrano in gioco quando sono richiesti movimenti molto rapidi, quindi in muscoli adulti e ben differenziati.

Le fibre SO sono molto resistenti alla fatica, sono utilizzate solo per attività posturali o per movimenti ripetitivi e per ragioni meccaniche ed energetiche non sono adatte a produrre movimenti veloci diventando termodinamicamente inefficienti quando si contraggono ad una velocità al di sopra della loro capacità di contrazione.

Le fibre muscolari lente hanno un'energia di ritorno molto più bassa rispetto a quelle veloci durante lo sviluppo e il mantenimento della tensione isoterica; inoltre, in un precedente studio (Fonseca *et al.*, 2003) è stato dimostrato che tali fibre influenzano in senso positivo la qualità della carne contribuendo sia alla sua succosità che alla sua tenerezza. Le fibre FOG, dette anche intermedie, sono caratterizzate da un metabolismo di

tipo ossido-glicolitico più versatile, in quanto capace di utilizzare entrambe le vie biochimiche a seconda delle necessità, al fine di ottenere energia per la contrazione.

Per quanto concerne la distribuzione percentuale dei tipi di fibra, a **120gg** di vita degli animali invece, si evidenzia una percentuale di fibre scure (SO) minore rispetto alle fibre intermedie (FOG) e alle chiare (FG) in tutti i muscoli analizzati. Come si evince dalla **Tabella 3**, la percentuale di fibre SO è maggiore nei muscoli del suino Casertano rispetto a quelli del Large White. Inoltre, in completa contrapposizione rispetto ai 60gg osservati precedentemente, a 120gg la percentuale delle fibre FG risulta maggiore rispetto agli altri due tipi di fibra, probabilmente a conferma della marcata differenziazione muscolare che richiede la presenza di fibre atte allo svolgimento di movimenti rapidi. In effetti, analizzando dettagliatamente il numero di fibre SO, la razza Casertana presenta una quantità di fibre ossidative significativamente maggiore rispetto alla Large White in sei muscoli analizzati su otto (Tabella 3a). Tale risultato rappresenta sicuramente un fattore positivo della qualità della carne per il suino Casertano.

Tabella 3	%			Razza
	SO	FOG	FG	
Semimembranoso	30	32	38	Casertana
	28	33	39	Large White
Semitendinoso	30	29	41	Casertana
	30	31	39	Large White
Bicipite Femorale	28	33	39	Casertana
	27	33	40	Large White
Quadricipite Femorale	28	30	42	Casertana
	28	33	39	Large White
Longissimus Dorsi	30	32	38	Casertana
	29	32	39	Large White
Diaframma	29	33	38	Casertana
	25	33	42	Large White
Massetere	29	33	38	Casertana
	28	32	38	Large White
Retratore del Bulbo	30	32	38	Casertana
	27	32	41	Large White

Tabella 3a. Confronto tra i Muscoli per le due razze in relazione al numero delle fibre SO a 120gg.

Muscolo	Razza			
	Casertano		Large White	
	Tipo di Fibre			
	SO		SO	
	n. fibre	d.s.	n. fibre	d.s.
Semimembranoso	60 <sup>A</sup>	± 4	56 <sup>B</sup>	± 2
Bicipite Femorale	56 <sup>A</sup>	± 3	54 <sup>B</sup>	± 3
Longissimus Dorsi	60 <sup>A</sup>	± 6	58 <sup>B</sup>	± 4
Diaframma	58 <sup>a</sup>	± 6	50 <sup>b</sup>	± 3
Massetere	58 <sup>A</sup>	± 3	56 <sup>B</sup>	± 4
Retratore del Bulbo	60 <sup>a</sup>	± 2	54 <sup>b</sup>	± 6

P < 0,0011 (A vs B)

P < 0,001 (a vs b)

Per quanto riguarda le proprietà contrattili, le singole fibre muscolari di suino hanno mostrato una grande eterogeneità. I valori della velocità di contrazione ( $V_0$ ) sono aumentati dalle isoforme di MHC lente o di tipo 1 a quelle veloci 2A, 2X e 2B e in relazione alle dimensioni corporee è stato rilevato che per le isoforme lente e veloci, la velocità di accorciamento decresce in maniera inversa rispetto alla massa corporea e l'espressione delle miosine veloci risulta più alta negli animali più piccoli rispetto a quelli più grandi (Pellegrino *et al.*, 2003). Il suino sembra rappresentare un'eccezione. I valori di  $V_0$  (massima velocità di contrazione) sono maggiori di quanto ci si possa aspettare sulla base della relazione con il peso corporeo. I muscoli di suino sono inaspettatamente ricchi di miosina veloce, includendo la miosina 2B come osservato solo nel suino Large White. I valori misurati nel suino sono più alti di quelli ottenuti per le fibre umane e simili a quelli delle fibre di coniglio (Pellegrino *et al.*, 2003).

Anche per quanto riguarda la tensione isometrica l'andamento rilevato è stato lo stesso. In particolare le miosine lente hanno sviluppato significativamente meno tensione isometrica ( $P_0$ ) rispetto alle miosine veloci, fatta eccezione per le MHC "pure" 2B, che hanno sviluppato una bassa tensione isometrica. A tal proposito le differenze statisticamente significative sono state trovate (Mascarello *et al.*, 2004) per le MHC lente

(topo e suino differenti da tutte le altre specie) e per le MHC 2B (suino differente da tutte le altre specie).

La bassa tensione isometrica delle fibre lente rilevata nel suino sembra essere il risultato della tendenza alla diminuzione della tensione isometrica in relazione all'aumento della taglia dell'animale: attualmente il valore più alto per le fibre lente è stato raggiunto nel topo (Pellegrino *et al.*, 2003).

### **Immunoistochimica**

#### **Isoforme MHC**

Dall'osservazione dei preparati immunoistochimici per l'identificazione delle diverse isoforme dell'MHC nei muscoli oggetto di studio, in accordo con altri autori abbiamo rilevato sia per la specie Casertana sia per la specie Large White a 0 e 15gg che l'isoforma di tipo 2B non è stata localizzata e solo dopo i 30gg si notava la presenza di tale isoforma ma solo nella Large White (**Fig. 13 - 15**).

L'isoforma 2B, generalmente considerata tipica dei piccoli mammiferi e marsupiali (Zhong *et al.*, 2001) non è espressa nei grandi mammiferi quali l'uomo (Smerdu *et al.*, 1994), il cavallo (Serrano *et al.*, 1996), il cane (Latorre *et al.*, 1993), il babuino ed il gatto (Lucas *et al.*, 2000; Schiaffino e Reggiani, 1996), ma chiaramente espressa nei muscoli del maiale e risulta presente nelle fibre di maggior diametro e pertanto la sua presenza è correlata con la muscolarità, così come osservato nel nostro studio nei muscoli della Large White.

Sebbene le fibre ibride risultino abbondanti nei muscoli di suino (Lefaucheur *et al.*, 2002) il nostro studio in accordo con Toniolo *et al.*, 2004 ha rivelato la presenza di molte fibre "pure", cioè fibre che contengono una sola isoforma di MHC e che le fibre intermedie e chiare risultano più abbondanti delle fibre lente e quindi scure nella maggior parte dei muscoli oggetto di studio.

All'interno delle isole, l'espressione MHC è stata spazialmente regolata dal centro alla periferia con una graduale espressione nell'ordine di I→IIa→ IIb in tutti i muscoli oggetto di studio.

Nei muscoli, avviene un graduale declino nel metabolismo ossidativo da 30gg a 60gg (I>IIa>IIb) e un incremento nel metabolismo glicolitico a 120gg con conseguente incremento delle sezioni trasversali delle fibre bianche (I<IIa<IIb). Ciò dimostra che le

proprietà metaboliche nonché la taglia delle fibre muscolari, variano a secondo del loro contenuto in MHC. Il gradiente nell'espressione di MHC (I→IIa →IIb) corrisponde ad un incremento di: attività dell'm-ATPase, velocità contrattile, costo di tensione, affaticamento e soglia di eccitazione, suggerendo che le fibre possono radunarsi dal centro alla periferia delle isole, in relazione all'intensità del movimento.

In tutti i muscoli oggetto di studio da 30 a 120gg l'isoforma di tipo 2B non è stata localizzata nella razza Casertana mentre nella Large White è stata individuata da 45 e fino a 120gg di età (**Foto 16 - 20**).

L'isoforma MHC di tipo 2B è generalmente localizzata nelle fibre di grosso diametro, ciò spiega come questo tipo di isoforma influisca sulla muscolarità. Per questo la sua presenza nel Large White a 60 gg dopo il parto è un dato atteso data la grossa muscolarità di questa razza.

#### ***Elettroforesi e RT-PCR***

La separazione elettroforetica delle isoforme di miosina è il metodo più utilizzato per la caratterizzazione delle singole fibre ed anche per la valutazione definitiva delle isoforme presenti nel tessuto.

Una buona separazione delle tre isoforme è stata ottenuta usando il sistema large gel.

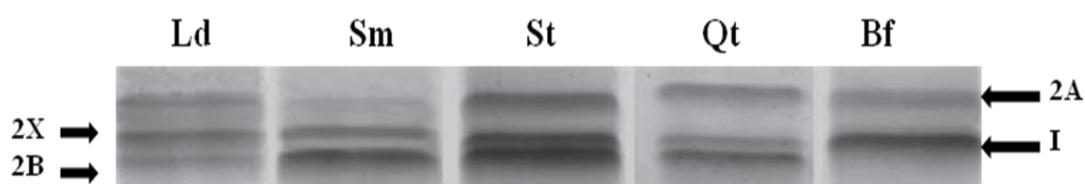
L'SDS-page ha mostrato a 60gg una banda inferiore che corrisponde all'isoforma MHCI, una banda superiore corrispondente alla MHCIIa ed una banda intermedia corrispondente alla isoforma MHCIIx, inoltre, nei muscoli della Large White è stata localizzata l'isoforma 2B. Tale isoforma, come già osservato con la localizzazione immunostochimica, è risultata assente nel suino Casertano.

In particolare, in entrambe le razze, si evidenzia una maggiore quantità dell'isoforma MHCI rispetto alla MHCIIa così come evidenziato nella localizzazione istochimica.

Fig. 21 - Immunolocalizzazione MHC in 4 muscoli di razza Casertana a 60gg



Fig. 22 - Immunolocalizzazione MHC in 5 muscoli di razza Large White a 60gg



Un'adeguata separazione delle isoforme MHCIIx e MHCIIa è determinante per individuare le relative proporzioni delle fibre muscolari. Come dimostrato da molti, le isoforme di miosina sono i maggiori determinanti della performance contrattile: la velocità di contrazione come il consumo di ATP dipendono dalla isoforma della miosina e quindi, la caratterizzazione delle proprietà contrattili delle singole fibre muscolari diventa significativa solo se la composizione della isoforma della miosina è definita con precisione. Il metodo migliore di identificazione dell'isoforma della miosina nelle singole fibre è quindi l'elettroforesi.

E' stato dimostrato che la maggiore presenza dell'isoforma MHC I all'interno del muscolo è associata ad una minore tenerezza della carne, mentre la presenza dell'isoforma MHCIIa ne aumenta la tenerezza. La relazione tra il tipo di fibra e la tenerezza è complessa, ma certamente la composizione delle fibre muscolari è di importanza cruciale nel determinare la qualità finale della carne.

Per caratterizzare le isoforme di MHC e in particolare quelle di tipo 2x abbiamo eseguito anche l'RT-PCR, strumento affidabile per determinare quali geni MHC sono trascritti in un campione di tessuto. Tale analisi effettuata su entrambi i suini non ha riscontrato risultati significativi per la Casertana in quanto l'isoforma 2B non era presente e quindi si riportano i dati relativi alla Large White sui muscoli sottoindicati a 60gg di età.

Il confronto tra i risultati di RT-PCR ed i risultati di elettroforesi su fasci di fibre di grandi dimensioni hanno rivelato la stretta correlazione tra l'mRNA e le proteine nei muscoli, con modelli distinti di espressione MHC. Ad esempio, sia l'mRNA che la determinazione della proteina indicano che nel massetere sono espressi solo i tipi 1 e 2A, mentre nel Longissimus dorsi sono espresse tutte e quattro le MHC. Il quadro che emerge dall'uso combinato dei vari metodi mostra che nel suino Large White:

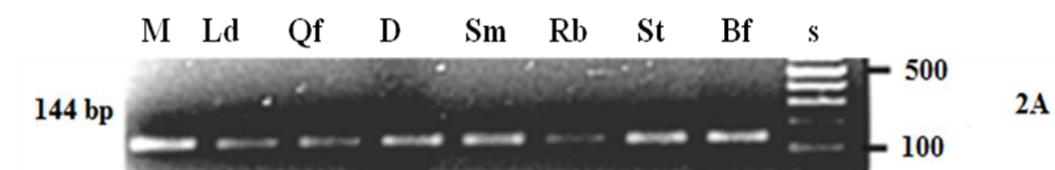
- (i) solo due isoforme MHC I e MHC-2A, sono espresse nel massetere, con la possibile presenza di limitate quantità di MHC-2X negli strati più superficiali;
- (ii) tre isoforme di MHC, cioè la I, la 2A e 2X sono espresse nel Diaframma e nel Quadricipite Femorale;
- (iii) quattro isoforme, MHC-I e tre isoforme veloci MHC (2A, 2X e 2B) sono espresse nel Longissimus dorsi e nel Bicipite Femorale.

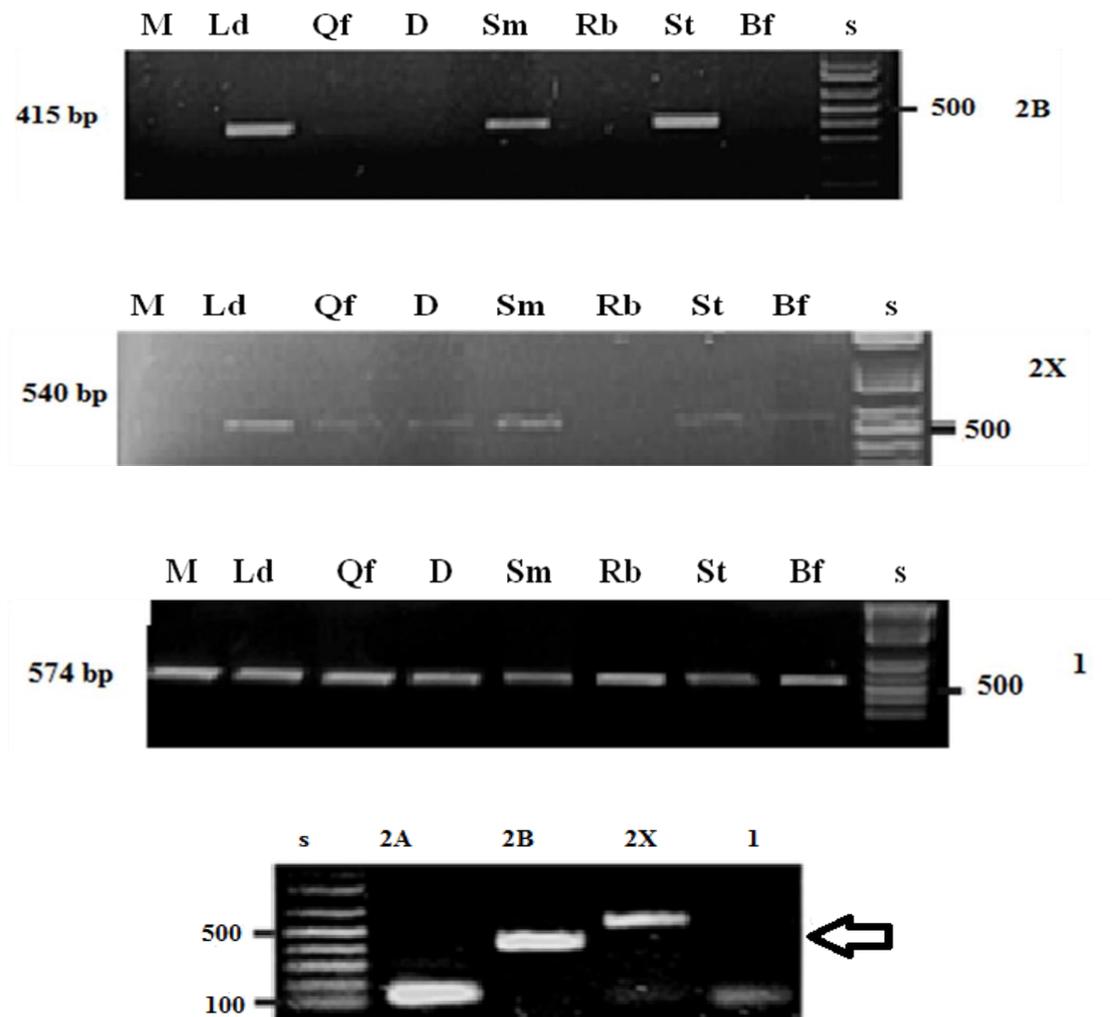
L'alta percentuale di fibre ibride sembra essere una caratteristica tipica dei muscoli della Large White. In particolare, le fibre veloci ibride, 2A-2X e 2X-2B, erano molto abbondanti, mentre le fibre fast -slow o 1-2 A erano appena presenti. Le ultime fibre sono anche chiamate 2C e sono frequenti nei piccoli animali da laboratorio, come ratti e conigli. Anche le fibre 2B erano rare o assenti anche se l'MHC-2B era abbondantemente espresso.

Le fibre ibride possono essere viste:

- (i) come mezzo per ottenere una messa a punto funzionale, poiché le loro proprietà contrattili sono collegate alle fibre pure;
- (ii) il risultato di una differenziazione incompleta;
- (iii) l'indicazione di una risposta differenziale dei singoli mionuclei.

**Fig. 23 - RT-PCR per suino Large White a 60gg in tutti i muscoli considerati**





### Gene Pax7

Dall'osservazione dei preparati immunohistochimici per l'identificazione della proteina codificante il gene Pax7 in accordo con Patruno *et al.* (2007) abbiamo rilevato sia per la specie Casertana che per la specie Large White nei muscoli oggetto di studio, la presenza di tale proteina sia a tempo 0 sia a 15 che a 30 giorni.

Tuttavia è stato rilevato un aumento nel numero di cellule Pax 7+ nelle cellule isolate a 30 giorni rispetto alle cellule isolate alla nascita.

Infatti abbiamo constatato come il numero di cellule Pax7+ sia stato significativamente inferiore ( $P < 0,05$ ) nelle cellule miogeniche isolate alla nascita rispetto a quelle estratte a 15gg e 30gg dopo il parto (Fig. 30-35), mentre il numero di cellule Pax7+/+MyoD rimaste costante nelle tre fasi esaminate. L'immunolocalizzazione del Pax7

eseguita su sezioni congelate del muscolo semitendinoso a 120gg conferma che le fibre muscolari esprimono un importo di gran lunga inferiore rispetto alle fibre sezionate alla nascita.

Il gene Pax7 è un regolatore di differenziazione in specifiche popolazioni di cellule staminali adulte ed è considerato un candidato determinante per la trascrizione diretta nelle cellule satellite (Seale *et al.*, 2000; Poleskaya *et al.* 2003).

Il gene Pax7 è espresso in particolare in cellule satelliti quiescenti ed in genere è presente durante la proliferazione e diminuisce drasticamente durante la differenziazione terminale dei miotubi, sebbene un recente studio (Zammit *et al.* 2006) ha dimostrato che alcune cellule satellite attivate possono ancora esprimere il Pax7 e tornare in uno stato di quiescenza.

Gli stessi autori hanno suggerito che la riduzione dell'espressione del Pax7, che si verifica durante la differenziazione miogenica, potrebbe essere semplicemente spiegata dal fatto che questa sottoregolazione non è un prerequisito per la differenziazione miogenica.

In conclusione i nostri risultati indicano che le cellule Pax7+ rappresentano tra il 10 e il 15% tra le cellule miogeniche trovate alla nascita, suggerendo che le suddette cellule forniscono un modesto contributo allo sviluppo di nuove fibre.

Nonostante siamo riusciti a comprendere maggiormente le funzioni del Pax7, il suo ruolo durante le prime fasi di sviluppo post-natale resta ancora da definire ed ulteriori studi risultano necessari.

Andando ad analizzare il tessuto muscolare a 60 e 120 gg abbiamo invece rilevato sia per la specie Casertana che per la specie Large White e in tutti e quattro i muscoli oggetto di studio che:

- il numero di cellule Pax7+ e Pax7+/MyoD+ è stato significativamente più basso nelle cellule miogeniche isolate alla nascita rispetto a quelle estratte a 30gg e a 60gg dopo il parto (**Fig. 36-39**);

- a 120gg dalla nascita invece, le cellule Pax7+ e Pax7+/MyoD+ sono diminuite drasticamente. In particolare nelle cellule miogeniche isolate a 60 giorni di età il numero di cellule Pax7+ (verde) è stato maggiore rispetto a quello delle cellule isolate a 120 giorni (**Fig. 40-43**).

I nuclei cellulari sono stati colorati con ioduro di propidio (rosso).

Inoltre la doppia immunocolorazione del Pax7 (verde) e della laminina (rossa) ha mostrato che la localizzazione del Pax7 è visibile sotto la membrana basale delle fibre (Patrino *et al.*, 2007).

Attraverso l'immunolocalizzazione eseguita sul tessuto dei muscoli oggetto di studio, è stato quindi osservato un più alto numero di cellule Pax7+ e Pax7+/MyoD+ durante le fasi post natali di crescita, almeno fino a 60gg rispetto a 120 giorni dopo il parto, suggerendo un diretto coinvolgimento del Pax7 durante la prima crescita post-natale. La prolungata espressione del Pax7 osservata nei muscoli suini, può essere utile per spiegare l'iperplasia osservata negli stadi di sviluppo del maiale. Infine abbiamo osservato anche che le cellule miogeniche isolate a 30 giorni di età hanno mostrato una maggiore espressione del Pax7 rispetto al MyoD.

#### ***RT-PCR Pax7 - IgF - TGF $\beta$***

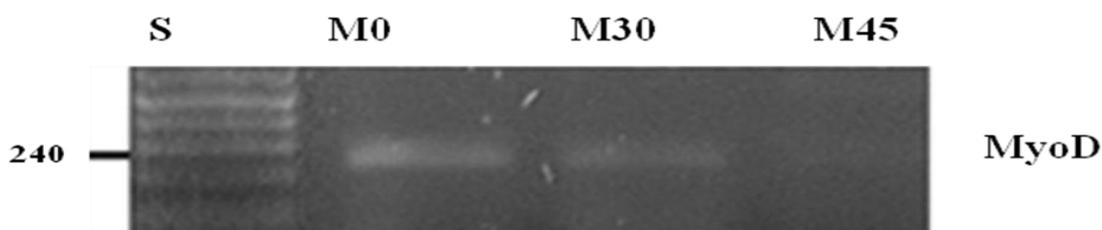
Nei vertebrati il muscolo scheletrico proviene dal mesoderma parassiale che forma i somiti. I precursori miogenici esprimono prima il gene PAX3 e successivamente queste cellule migrano dal somite per svilupparsi in miotubi primari in seguito all'attivazione di alcuni fattori di regolazione (MRFs) che sono classificati come fattori miogenici: Myf5 e MyoD, e fattori di differenziamento quali miogenina, MRF4 e MEF2. PAX3, MyoD e Myf5. Un fattore particolarmente interessante è la presenza di una terza generazione di miotubi che è stata descritta nelle pecore, nell'uomo e nei bovini, durante la vita fetale (circa il 40% dell'età gestazionale), mentre nel suino appare in due fasi distinte: poco dopo la nascita e dalla terza-quarta settimana di vita post-natale (Lefaucheur *et al.* 1995; Mascarello *et al.* 1992; Picard *et al.* 2002). Nel ratto si è osservato che la fase iperplastica continua anche dopo la nascita e si rigenerano nuove fibre muscolari nello spazio interstiziale del muscolo scheletrico (Tamaki *et al.* 2002 - Tamaki *et al.* 2003). I suini rappresentano quindi un modello sperimentale peculiare in quanto è possibile studiare l'espressione dei fattori miogenici durante le fasi di riposo attivo e di crescita iperplastica. Nuovi miotubi potrebbero derivare dalle classiche cellule "satellite" o da più cellule staminali primitive, di origine ematopoietica. Il gene Pax7 è un regolatore chiave nella differenziazione muscolare nell'ambito di specifiche popolazioni di cellule staminali adulte ed è un buon elemento che aiuta a distinguere le cellule satelliti attivate. Infine è importante osservare che una

normale crescita post-natale richiede anche un "espressione controllata di miostatina", un gene la cui mutazione determina sia iperplasia che ipertrofia.

Abbiamo osservato nei suini oggetto di studio che gli MRFs studiati sono tutti espressi durante le fasi di sviluppo post-natale. Riportiamo i dati più significativi relativi al MyoD e Myf5 riscontrati nei muscoli di suino Casertano e quelli relativi al Myog e MSTN nel suino Large White. E' stata osservata una diminuzione dei fattori MyoD, Myf5 e miogenina, dai primi giorni fino ai giorni 30 e 45 dopo la nascita. Abbiamo anche iniziato a sviluppare un approccio quantitativo tramite Real Time PCR e i risultati preliminari dimostrano un'espressione di MyoD, Myf5 e Pax7 mRNA più alta nei muscoli nelle fasi post-natale rispetto ai successivi stadi di sviluppo. Questo studio suggerisce che i miotubi terziari del suino potrebbero essere impegnati non solo durante la gravidanza, ma anche nelle prime fasi dello sviluppo postnatale.

Sono stati progettati un paio di primer degenerati da una sequenza di aminoacidi conservati di molecole di Pax7 di specie di mammiferi e utilizzati nella PCR e nelle reazioni di sequenziamento, in modo da poter eseguire una PCR quantitativa (Fig.24-28).

**Fig. 24 - RT-PCR Fattori trascrizionali MyoD in suino Casertano**



**Fig. 25 - RT-PCR Fattori trascrizionali Myf5 in suino Casertano**

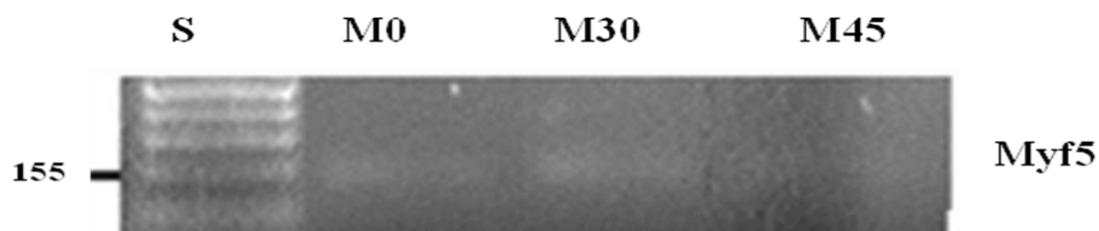


Fig. 26 - RT-PCR Fattori trascrizionali Myog in suino Large White

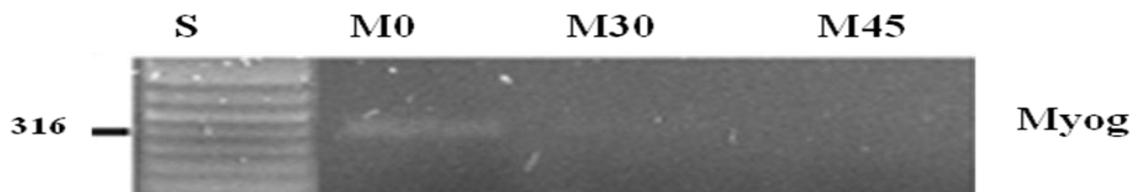


Fig. 27 - RT-PCR Fattori trascrizionali MSTN in suino Large White

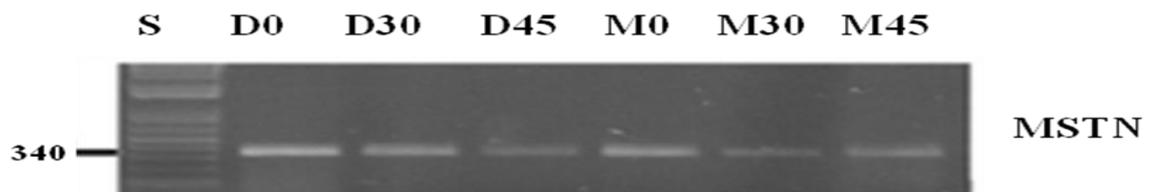


Fig. 28 - Frammenti nucleotidici del Pax 7 del suino Casertano

```

5' - ctgggtgggggttttcatcaatgggcgacccctgccccaaccacatccgcccacaagatagtagagatggcccaccacggcatccggccctg
  L G G V F I N G R P L P N H I R H K I V E M A H H G I R P C
  tgtcattctcccgccagctgctgtgtctccatggctgtgtctccaagatcctctgcccgtaccaagagaccgggtccatccggcctgggg
  V I S R Q L R V S H G C V S K I L C R Y Q E T G S I R P G
ccattggaggcagcaagcccagacaggtggcgactccggatgtggagaaaaagat- 3'
A I G G S K P R Q V A T P D V E K K

```

La traduzione del prodotto ottenuto dalla PCR ha rivelato una forte somiglianza con altre sequenze del Pax7, il più alto grado di identità tra i nucleotidi (94%) è stato evidente con l'uomo mentre la sequenza del Pax7 di questo frammento ha mostrato una identità del 100% con altre specie. L'RT-PCR effettuata nei muscoli in relazione ai periodi scelti di sviluppo postnatale, utilizzando primer specifici non hanno mostrato differenze significative nei livelli di Pax7 mRNA.

La crescita muscolare durante le fasi di sviluppo post-natale dei suini avviene attraverso meccanismi di ipertrofia nonché la presenza di una terza generazione di miotubi e un'alta percentuale proliferativa delle cellule satelliti dopo la nascita. I nostri studi sui fattori positivi e negativi di regolamentazione coinvolti nella crescita iperplastica dei muscoli

di suini sono stati effettuati con l'obiettivo di avere un quadro più chiaro su quale fattore di crescita fosse coinvolto durante lo sviluppo dei miotubi terziari.

Questi ultimi presentano un diametro piccolo e sono strettamente associati con fibre provenienti dai miotubi primari e secondari, inoltre, sono stati osservati solo in animali di grandi dimensioni probabilmente a causa della maggiore massa muscolare.

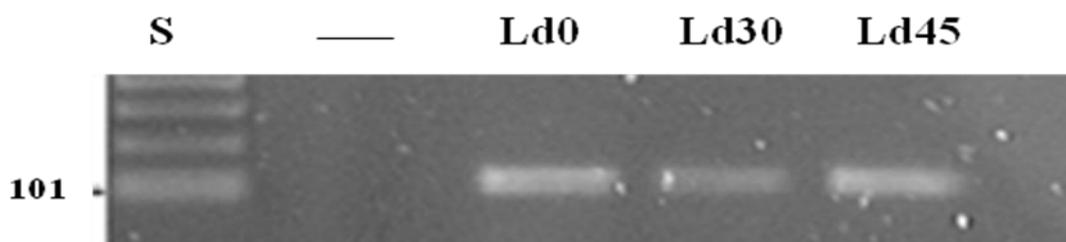
L'espressione di mRNA e di alcuni MRFs è stata rilevata nei muscoli suini attraverso PCR standard post-natale. I fattori determinanti MyoD e Myf5 erano espressi regolarmente fino alla terza settimana di età seguiti da un trend decrescente, mentre i fattori di differenziazione miogenina e MRF4 sembravano diminuire già dopo la prima settimana dalla nascita. Sono stati esaminati tali fattori per tutti i muscoli oggetto di studio, si riportano di seguito i risultati ottenuti sul Longissimus dorsi tramite PCR standard. In definitiva non è stato osservato nessuna differenza significativa nel pattern di espressione degli MRFs nei muscoli analizzati.

E' importante notare che nei soggetti neonati, la differenziazione delle isoforme adulte di fibre veloci non era ancora completa. Risultati preliminari su Myf5 e MyoD ha mostrato un livello di mRNA superiore a 1 giorno dopo la nascita, rispetto alle fasi successive di sviluppo in tutti i muscoli esaminati, a conferma dei dati dell' RT PCR. Considerando che l'espressione post-natale di MyoD e Myf5 è molto più bassa dell'espressione pre-natale e che il loro ruolo è specificamente legato all'attività delle cellule satellite dopo la nascita, i nostri risultati si inseriscono bene nell'ipotesi secondo la quale MyoD e/o Myf5 guidano i mioblasti della fase prenatale verso la formazione di miotubi di terza generazione con una diminuzione dell'espressione dell' mRNA dopo la nascita.

Inoltre, abbiamo analizzato il gene Pax7, necessario per l'attivazione delle cellule miogeniche satelliti attraverso vari sistemi di segnalazione. La PCR qualitativa non ha mostrato differenze significative nel livello dell' mRNA Pax7 dopo la nascita. I risultati preliminari ottenuti dalla Real Time PCR quantitativa indicano che il livello dell' mRNA Pax7 è più alto alla nascita rispetto alle fasi successive. Queste osservazioni potrebbero indicare la presenza di cellule satelliti in procinto della nascita. Le molecole studiate sono sicuramente coinvolte nella determinazione del muscolo anche grazie ai miotubi terziari attivati, probabilmente nello sviluppo post-natale. Questo studio rappresenta un passo preliminare all'analisi della crescita post natale dei suini Large White e Casertano con

l'obiettivo di discernere le cellule satelliti dal resto della popolazione, che sono coinvolte nella formazione di nuove fibre muscolari insieme ai fattori analizzati, quali Pax7, MyoD e Myf5.

**Fig. 29 - RT-PCR qualitativa del Pax 7 del Longissimus Dorsi razza Casertana**



#### ***Ibridazione in situ e Immunistoichimica: Miostatina e Miogenina***

Nei muscoli oggetto di studio abbiamo rilevato sia per il suino Casertano sia per il Large White che la miostatina ha mostrato una colorazione molto intensa alla nascita ed ancora fino ai 45 giorni post-parto per poi ridursi notevolmente a 60 e a 120 giorni di età.

In modo particolare quanto da noi rilevato è in accordo con Patruno *et al.* 2008 secondo cui nel muscolo Longissimus dorsi campionato durante l'embriogenesi, la miostatina ha mostrato una forte reazione durante gli stadi prenatali dello sviluppo (a 70 giorni dopo la fecondazione) mentre negli adulti, l'intensità e la distribuzione della colorazione è stata notevolmente ridotta. In particolare alla fine del periodo di gestazione (100 giorni dopo la fecondazione) la colorazione della miostatina decresce ed è localizzata principalmente nelle miosine di tipo 1 o lente come indicato dalle sezioni seriali congelate di muscolo Longissimus dorsi colorate con il BA-F8 mAb, anticorpo specifico delle MHC del tipo 1 o lente. Dopo la nascita, solo pochissime fibre hanno presentato una moderata reattività di tipo nucleare per la miostatina.

Anche per ciò che concerne la miogenina abbiamo rilevato la sua presenza fino a 60 giorni dopo il parto mentre essa è risultata completamente assente a 120 giorni di età in tutti i muscoli oggetto di studio.

Inoltre, è stato rilevato che la doppia immunocolorazione, verde per la miogenina e rossa per la miostatina, effettuata dopo 30gg dalla nascita, ha mostrato un'intensa reattività per entrambe le molecole anche se con una diversa localizzazione cellulare. La

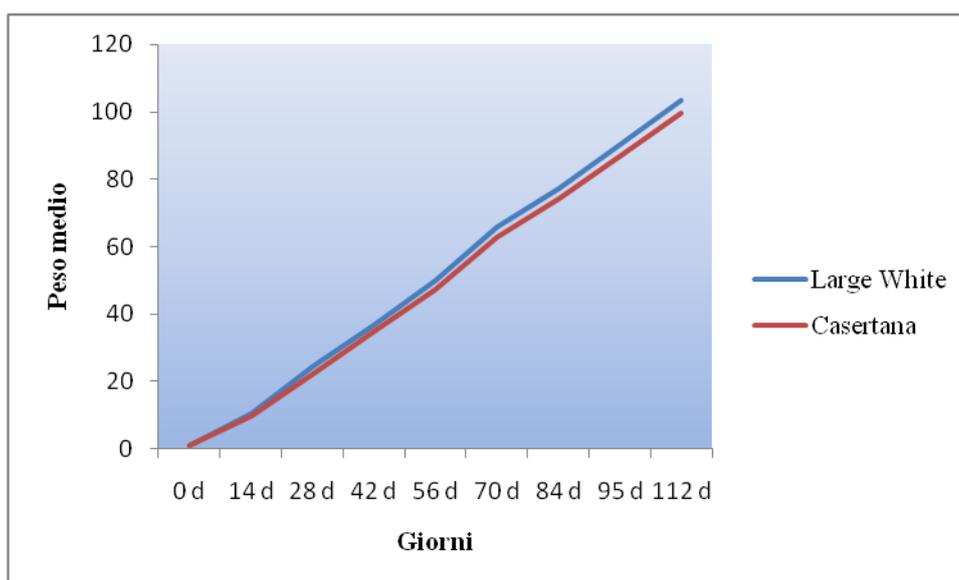
colorazione della miogenina è stata localizzata nei nuclei delle fibre muscolari dei suini, mentre la colorazione della miostatina (MSTN) è stata localizzata nel citoplasma (Fig. 44 - 51).

#### **Valutazione della crescita corporea e della carcassa**

La produzione di carne di maiale è una dinamica in continuo cambiamento. I produttori valutano di continuo i sistemi di produzione, con l'obiettivo di migliorare o mantenere la loro posizione concorrenziale. I suini oggetto di studio (circa 130) sono stati alimentati così come descritto precedentemente e allevati allo stesso modo e quindi allo stato brado. Considerando la dieta a cui sono stati sottoposti e le condizioni ambientali in cui sono stati allevati, tra le varie analisi si è cercato di configurare al meglio il loro profilo di crescita corporea.

Gli animali sono stati pesati ad intervalli di tempo regolari, con lo scopo di valutare come variavano le curve di crescita in funzione della razza, delle condizioni ambientali e del genotipo. Gli animali, nonostante siano di razza diversa, hanno mostrato un andamento di crescita simile. Le curve di crescita si riferiscono a un periodo che va da **0 a 112 giorni**, durante il quale i suini sono stati pesati ad intervalli regolari fino al raggiungimento dei  $230 \pm 25$  kg di peso. In particolare si è osservato che lo sviluppo della Large White da circa 60 giorni in poi avveniva più rapidamente rispetto alla Casertana, mostrando una lieve differenza rispetto alla razza precedente.

**Graf. 1 - Curva di crescita corporea suini Casertana e Large White**



Infine, abbiamo valutato le caratteristiche della carcassa dei suini e particolarmente dei quattro principali componenti chimici del peso corporeo:

- (EBW: Empty Body Weight);
- acqua (Wa);
- proteine (P);
- lipidi (L);
- ceneri.

Tale tipo di analisi può essere utile a stabilire come la composizione corporea possa essere influenzata dal genotipo, dal genere e dal livello proteico della dieta. Per una previsione accurata dell' **Empty Body Weight** è stato necessario un'attenta previsione di Wa da P e L, in quanto sicuramente l'acqua è il componente contenuto in maggiore quantità nel corpo suino.

Poiché l'acqua è strettamente associata a proteine presenti nel tessuto magro e viscerale degli organi, è stato possibile utilizzare la seguente relazione:

$$W_a \text{ (kg)} = a \times P \text{ (kg)} b$$

dove i parametri a e b vengono determinati statisticamente. Il parametro di scala (b) è costante, misura circa 0,855 (ARC, 1981; de Greef, 1995; Emmans e Kyriazakis, 1995; Coudenys *et al.* 1998; Weis *et al.* 2001), e rappresenta la diversa distribuzione di P nei diversi gruppi corporei. Il parametro (a) varia tra circa 4,90 e 5,62 per i diversi genotipi di suino. (ARC, 1981; de Greef, 1995; Emmans e Kyriazakis, 1995; Coudenys, 1998; Weis, 2001), e sembra positivamente relazionato a (P) (Emmans e Kyriazakis, 1995) o al tasso di massimo deposito corporeo di proteine (PDmax).

Le ceneri possono essere previste da P con una certa precisione, mediante la relazione:

$$\text{ceneri (kg)} = c \times P \text{ (kg)}$$

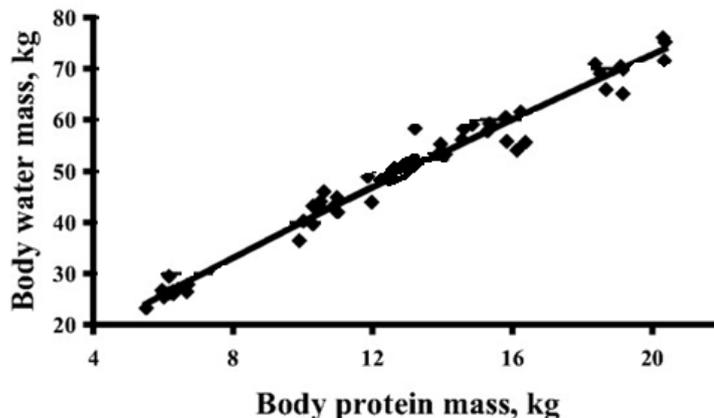
con (c) che varia tra 0,186 e 0,210 (ARC, 1981; Moughan *et al.* 1990; Hendriks e Moughan, 1993; de Greef, 1995; Whittemore *et al.* 1983), che riflette la stretta associazione tra tessuto osseo, che contiene la maggior parte delle ceneri del corpo, e massa magra. La variabilità osservata in questo parametro ha uno scarso impatto sulla previsione delle caratteristiche di carcassa e di BW. Data l'associazione tra P, Wa, e cenere, la maggior parte della variazione della composizione chimica del corpo tra i diversi gruppi di suini può essere attribuito a variazione del tenore di L (**Tabella 4**).

**Tabella 4. Composizione chimica (%) del Empty Body Weight dei suini a vari pesi corporei.**

Componenti Corporee	Peso Corporeo		EBW	
	7kg	25kg	Large White	Casertana
Acqua	65	68	49	65
Proteine	15	15	13	17
Lipidi	16	13	36	16
Ceneri	4	4	4	4

Qui di seguito abbiamo riportato il caso del suino Casertano, in quanto nel caso del suino Large White abbiamo riscontrato un andamento molto simile.

**Grafico 2: Relazione tra massa di acqua corporea e massa di proteine corporee in maschi di suino Casertano. I suini variavano in BW tra 50 e 125Kg. ( $Y=5.5412X0.8593$ ;  $n=55$ ;  $r^2=0.8913$ )**



Poiché l'obiettivo di produzione è sostanzialmente quello di massimizzare la qualità finale del prodotto trasformato, possiamo affermare che la qualità stessa sia in qualche modo correlata alla composizione chimica corporea e a quella della carcassa dell'animale. In generale, il ritmo di crescita e la composizione corporea dipendono principalmente dagli apporti alimentari in interazione con le caratteristiche genetiche degli animali e le condizioni in cui vengono allevati (Bosi *et al.*, 2004). Quindi possiamo affermare che esiste

uno stato di maturità e di ingrassamento che possono essere definiti ottimali, almeno in termini di rapporti tra carne magra e grasso, tra proteine e acqua e tra proteine e lipidi.

La mancanza di informazioni relative alla composizione chimica corporea di suini implica anche una scarsa conoscenza dei livelli di ritenzione proteica e lipidica che si verificano nel corso della crescita. Tutto ciò introduce notevoli elementi di incertezza nella definizione degli apporti alimentari raccomandati sia in termini energetici che proteici. Nel caso esaminato, quindi, i dati raccolti rappresentano un fattore importante che necessita di ulteriori approfondimenti in vista di una loro utilizzazione per delineare al meglio una dieta che consenta di ottenere i giusti apporti per delle carni qualitativamente ottimali.

**Conclusioni: Impatto della ricerca nelle produzioni alimentari**

Tale ricerca rende disponibili tutte le conoscenze tecnico-scientifiche e originali necessarie per introdurre nelle PMI operanti nel settore della produzione e della trasformazione della carne suina quelle innovazioni in grado di:

- favorire lo sviluppo sostenibile del territorio;
- valorizzare la produzione e la commercializzazione dei prodotti tipici trasformati di suino;
- migliorare le condizioni economiche e le prospettive future delle aziende già operanti;
- implementare le biotecnologie necessarie per lo studio dei muscoli di suino;
- sviluppare tecniche di produzione all'avanguardia;
- migliorare la qualità delle carni.

Inoltre, si possono conseguire importanti specifiche quantitative per il comparto suinicolo, in particolare:

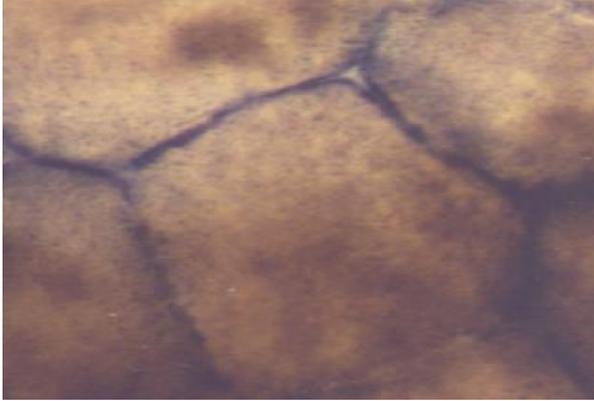
- migliorare le tecnologie di produzione per il settore suino salvaguardandone la qualità, tutto questo misurato attraverso i marker definiti ed il confronto con le produzioni classiche;
- migliorare le tecnologie di trasformazione dei prodotti agro-alimentari.

Tale ricerca potrebbe dare un contributo tecnico-scientifico all'industria della carne suina, conoscenze che avranno come fine ultimo il miglioramento dei sistemi di produzione e di trasformazione del comparto industriale in esame.

E' ovvio che attraverso l'ottimizzazione degli apparati produttivi, la tutela del benessere animale, l'osservanza in ogni fase della filiera produttiva di rigorose norme e la realizzazione di una catena distributiva organizzata si potrebbe realizzare il lancio di quest'importante alimento e rendere ancora più competitivi i prodotti trasformati di origine suina e i derivati nel mercato campano.

## Figure Istochimica

**Fig. 1**



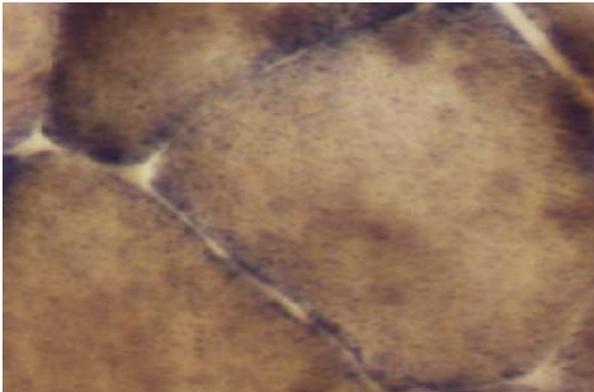
Semimembranoso

Razza Casertana (0gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata con tipizzazione istochimica per rilevare l'attività ATPasica miofibrillare e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare.

La foto mostra esclusivamente fibre SO (slow-twitch oxidative) (x400)

**Fig. 2**



Semitendinoso

Razza Casertana (0gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata con tipizzazione istochimica per rilevare l'attività ATPasica miofibrillare e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare.

La foto mostra esclusivamente fibre SO (slow-twitch oxidative) (x400)

**Fig. 3**



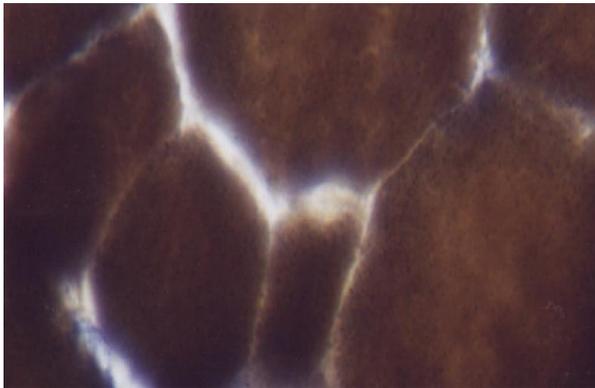
Semimembranoso

Large White (0gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata con tipizzazione istochimica per rilevare l'attività ATPasica miofibrillare e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare.

La foto mostra esclusivamente fibre SO (slow-twitch oxidative) (x400)

**Fig. 4**



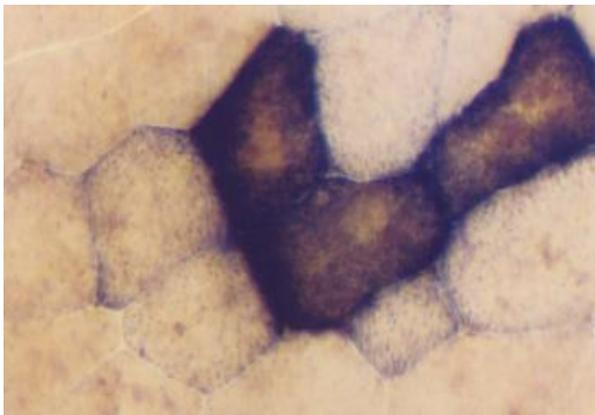
Semitendinoso

Large White (0gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata con tipizzazione istochimica per rilevare l'attività ATPasica miofibrillare e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare.

La foto mostra esclusivamente fibre SO (slow-twitch oxidative) (x400)

**Fig. 5**



Bicipite Femorale

Razza Casertana (45gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata istochimicamente per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra fibre SO (slow-twitch oxidative) FG (fast-twitch glycolitic) e FOG (fast-twitch oxidative glycolitic) (x400)

**Fig. 6**

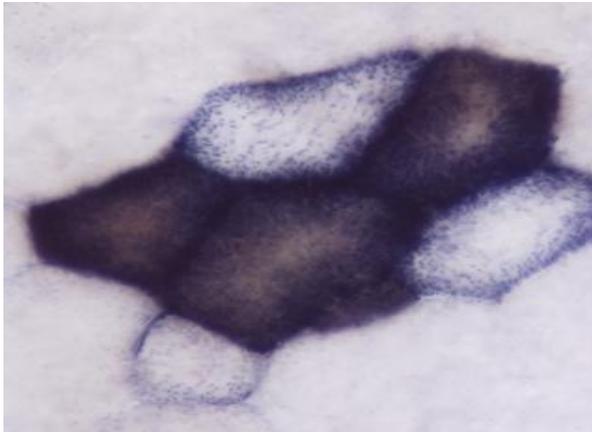


Quadricipite Femorale

Razza Casertana (45gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata istochimicamente per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra fibre SO (slow-twitch oxidative) FG (fast-twitch glycolitic) e FOG (fast-twitch oxidative glycolitic) (x400)

**Fig. 7**

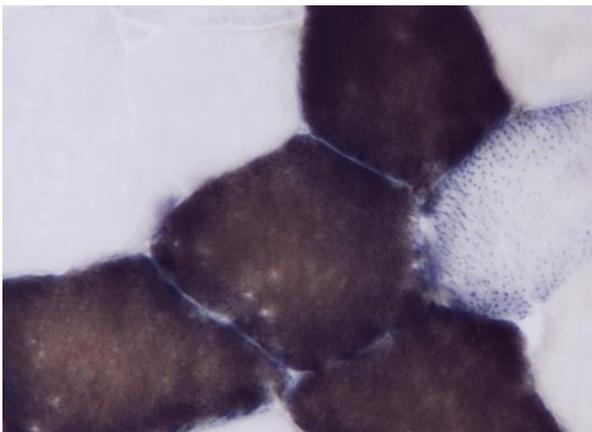


Bicipite Femorale

Large White (45gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata istochimicamente per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra fibre SO (slow-twitch oxidative) FG (fast-twitch glycolitic) e FOG (fast-twitch oxidative glycolitic) (x400)

**Fig. 8**

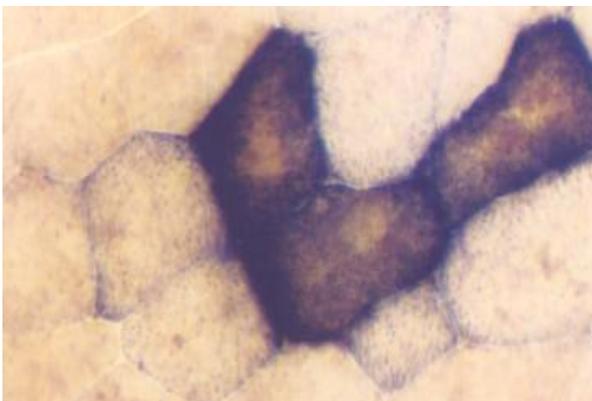


Quadricipite Femorale

Large White (45gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata istochimicamente per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra fibre SO (slow-twitch oxidative) FG (fast-twitch glycolitic) e FOG (fast-twitch oxidative glycolitic) (x400)

**Fig. 9**



Longissimus Dorsi

Casertana (90gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata istochimicamente per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra fibre SO (slow-twitch oxidative) FG (fast-twitch glycolitic) e FOG (fast-twitch oxidative glycolitic) (x400)

**Fig. 10**

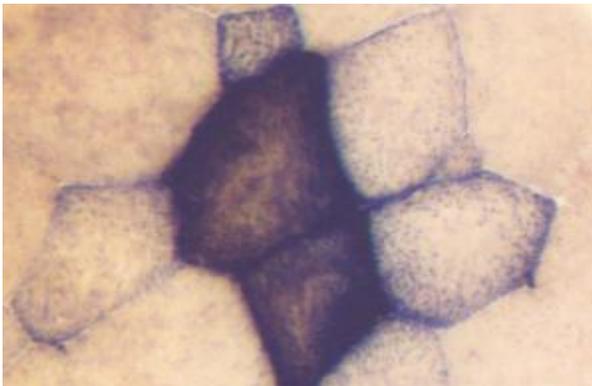


**Diaframma**

Casertana (90 gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata istochimicamente per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra fibre SO (slow-twitch oxidative) FG (fast-twitch glycolitic) e FOG (fast-twitch oxidative glycolitic) (x400).

**Fig. 11**

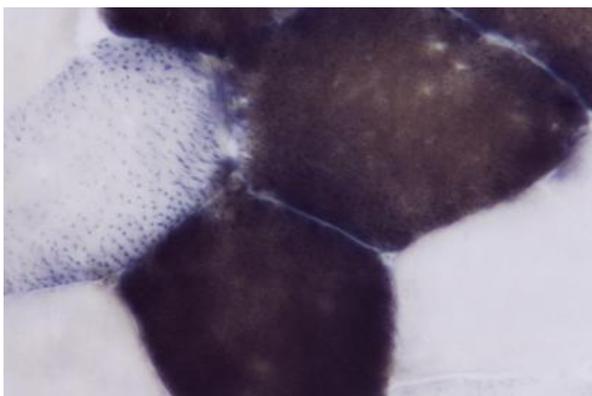


**Retratore del Bulbo**

Large White (120gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata istochimicamente per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra fibre SO (slow-twitch oxidative) FG (fast-twitch glycolitic) e FOG (fast-twitch oxidative glycolitic) (x400).

**Fig. 12**



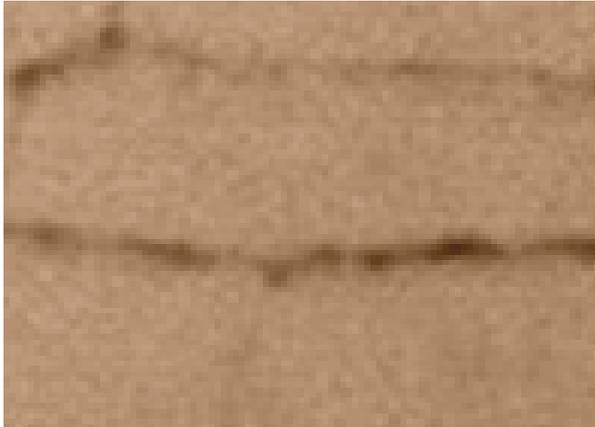
**Massetere**

Large White (120gg post-parto)

Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata istochimicamente per rilevare l'attività ATPasica e Succinico deidrogenasica della fibra muscolare. La foto mostra fibre SO (slow-twitch oxidative) FG (fast-twitch glycolitic) e FOG (fast-twitch oxidative glycolitic) (x400).

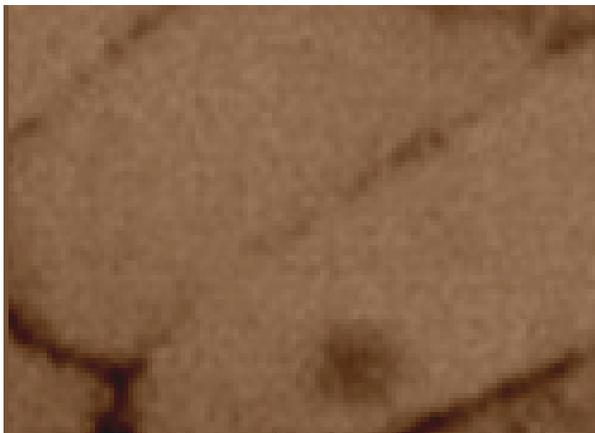
## Figure Immunoistochimica

**Fig. 13**



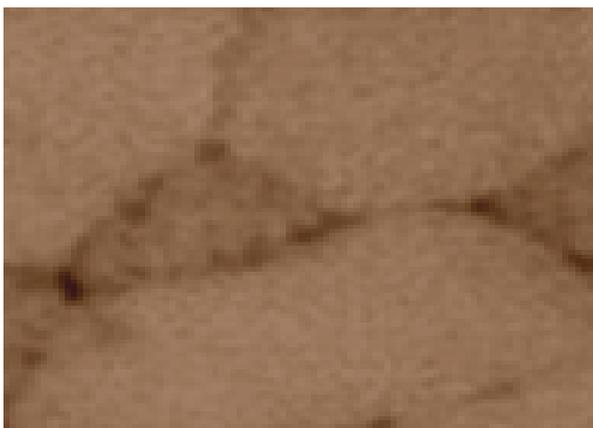
Semimembranoso  
Razza Casertana (0gg post-parto)  
Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata immunohistochimicamente per la localizzazione della miosina MHC tipo 2B. (x400)

**Fig. 14**



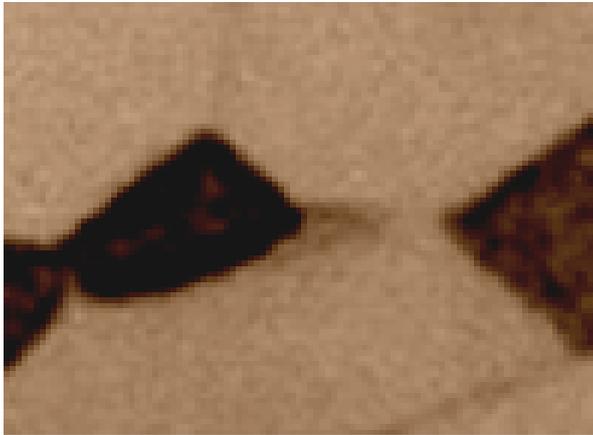
Semimembranoso  
Large White (0gg post-parto)  
Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata immunohistochimicamente per la localizzazione della miosina MHC tipo 2B. (x400)

**Fig. 15**



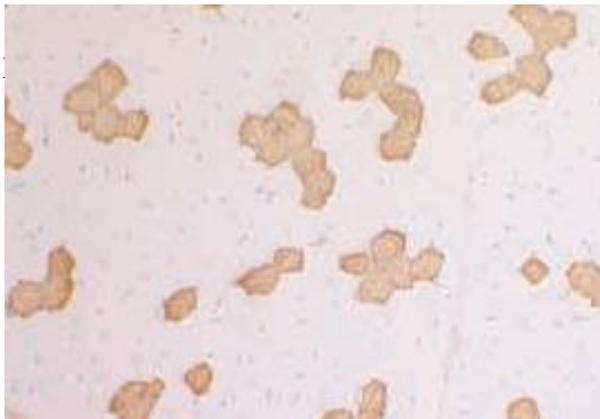
Semimembranoso  
Large White (30gg post-parto)  
Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata immunohistochimicamente per la localizzazione della miosina MHC tipo 2B. (x400)

**Fig. 16**



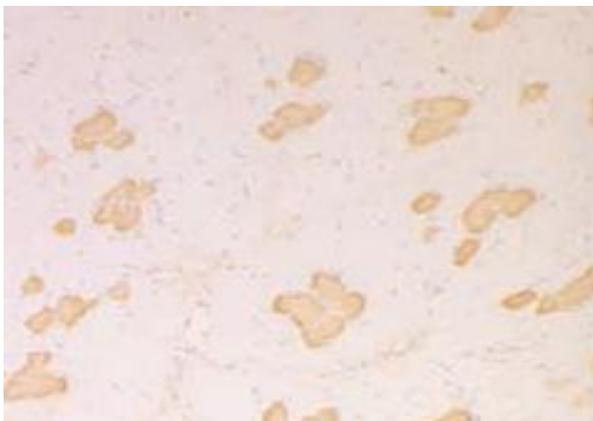
Semimembranoso  
Large White (45gg post-parto)  
Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata immunostochimicamente per la localizzazione della miosina MHC tipo 2B. (x400)

**Fig. 17**



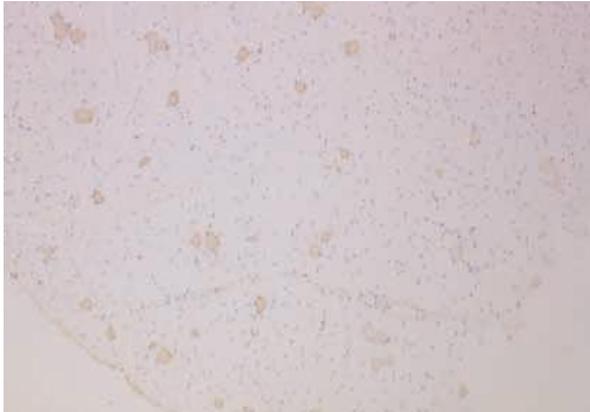
Quadricipite Femorale  
Large White (45gg post-parto)  
Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata immunostochimicamente per la localizzazione della miosina MHC tipo 2B. (x250)

**Fig. 18**



Bicipite Femorale  
Large White (90gg post-parto)  
Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ ) trattata immunostochimicamente per la localizzazione della miosina MHC tipo 2B. (x250)

**Fig. 19**



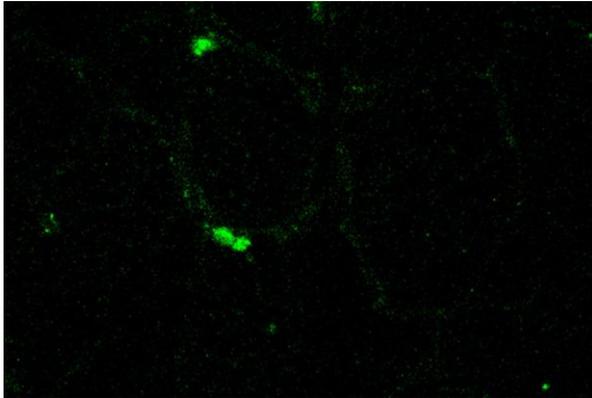
Longissimus Dorsi  
Large White (120gg post-parto)  
Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ )  
trattata immunohistochimicamente per la  
localizzazione della miosina MHC tipo  
2B. (x250)

**Fig. 20**



Quadriceps Femorale  
Razza Casertana (120gg post-parto)  
Sezione trasversale di muscolo (8 $\mu$ )  
trattata immunohistochimicamente per la  
localizzazione della miosina MHC tipo  
2B. (x250)

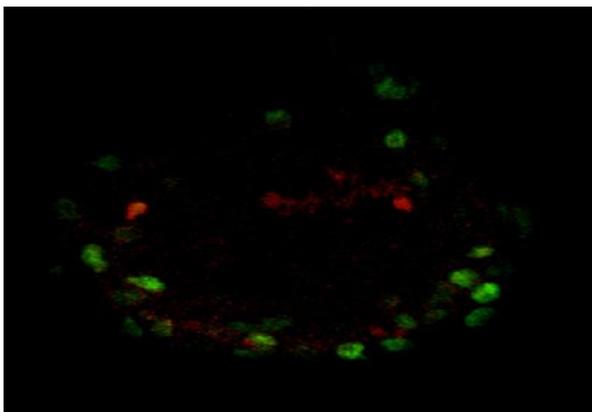
**Fig. 30**



Casertana

Espressione del gene della proteina MyoD in verde a 0 giorni di vita nel muscolo Semimembranoso

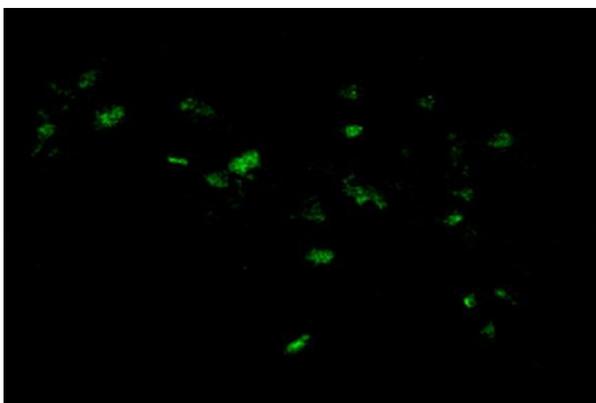
**Fig. 31**



Casertana

Espressione del gene Pax7 in verde e del MyoD in rosso a 30giorni nel muscolo Semitendinoso

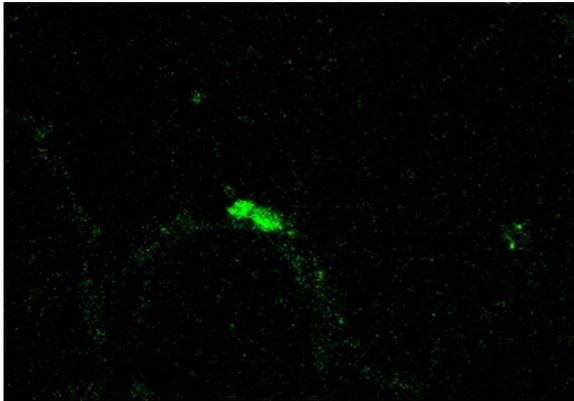
**Fig. 32**



Casertana

Espressione del gene della proteina MyoD in verde a 30 giorni di vita nel muscolo Quadricipite femorale

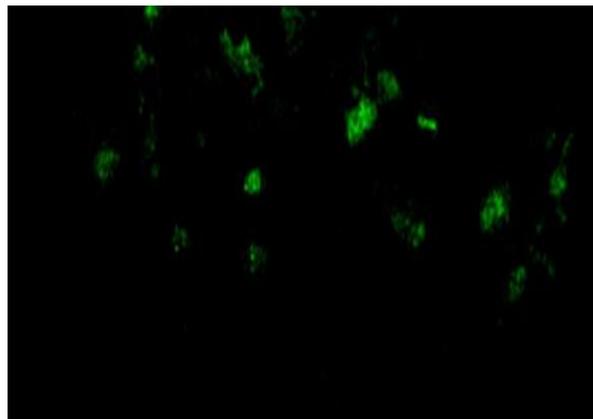
Fig. 33



Large White

Espressione del gene della proteina MyoD in verde a 0 giorni di vita nel muscolo Longissimus dorsi

Fig. 34

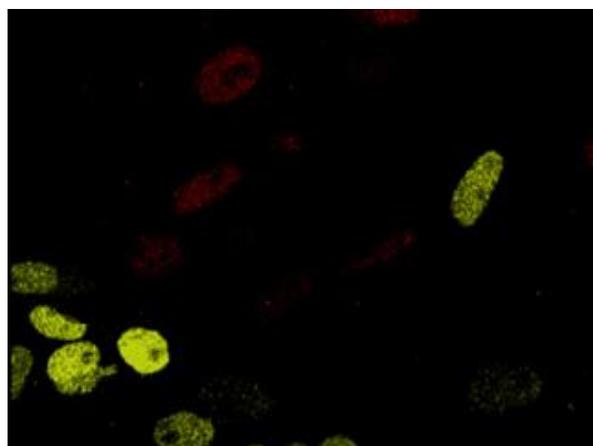


Large White

Massetere

Espressione del gene della proteina MyoD in verde a 30 giorni di vita

Fig. 35



Casertana (60 gg post-parto)

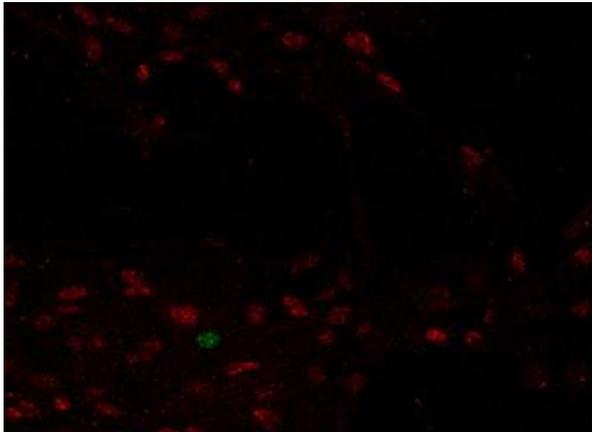
Diaframma

Espressione del gene Pax 7 in verde

Espressione dei nuclei cellulari colorati con ioduro di propidio in rosso.

L'immunolocalizzazione eseguita su sezioni trasversali del tessuto muscolare ha mostrato una intensa colorazione per l'anticorpo Pax 7.

**Fig. 36**



Semimembranoso

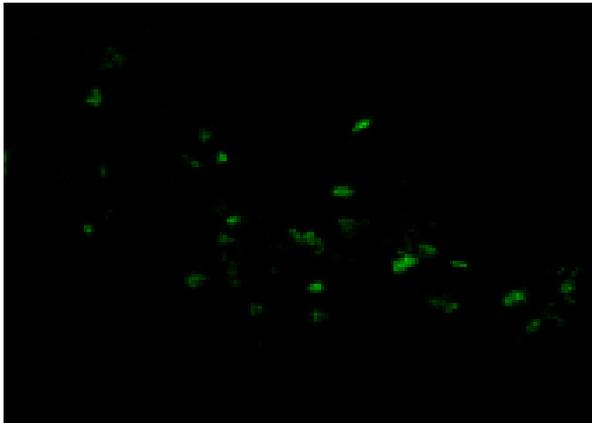
Casertana (120 gg post-parto)

Espressione del gene Pax 7 in verde

Espressione dei nuclei cellulari colorati con ioduro di propidio in rosso.

L'immunolocalizzazione effettuata su sezioni trasversali di tessuto muscolare ha mostrato una colorazione notevolmente ridotta dell'anticorpo Pax

**Fig. 37**



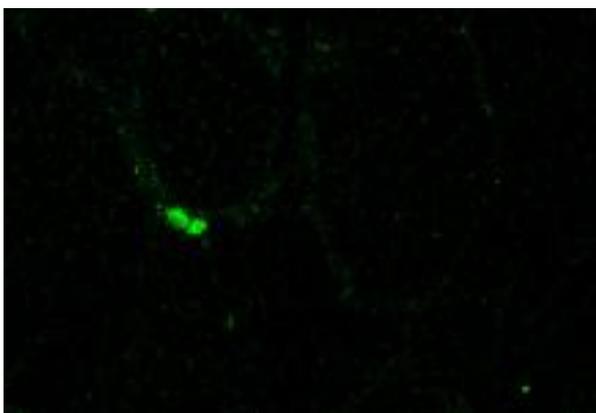
Quadricipite Femorale

Casertana (60 gg post-parto)

Espressione del gene Pax 7 in verde.

L'immunolocalizzazione effettuata su sezioni trasversali di tessuto muscolare ha mostrato una modesta colorazione per l'anticorpo Pax7.

**Fig. 38**



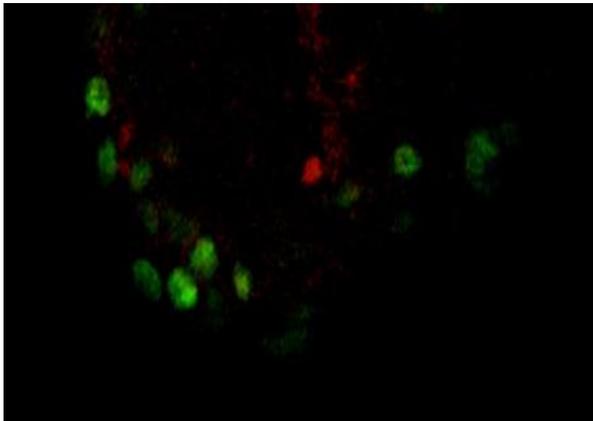
Quadricipite Femorale

Casertana (120 gg post-parto)

Espressione del gene Pax 7 in verde.

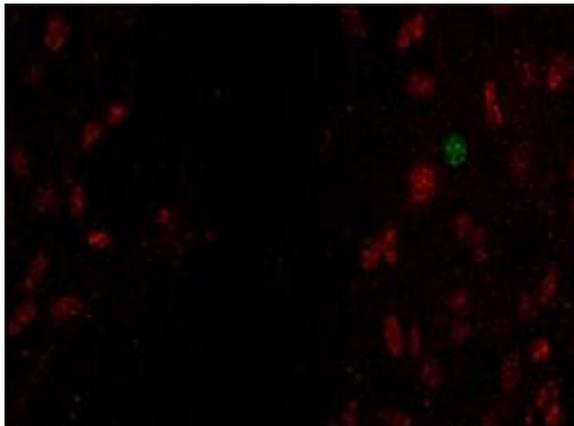
L'immunolocalizzazione effettuata su tessuto muscolare ha mostrato solo pochi nuclei positivi.

**Fig. 39**



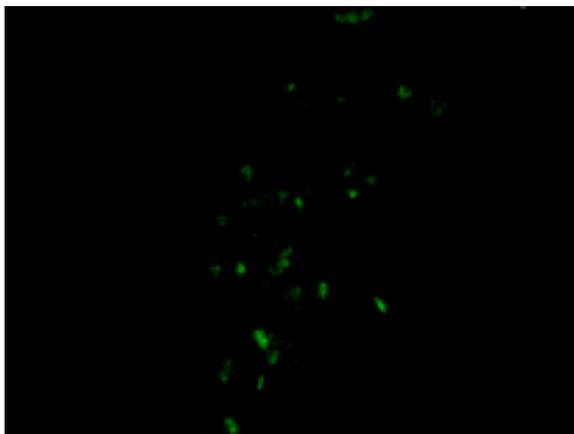
Semimembranoso  
Casertana (60 gg post-parto)  
Espressione del gene Pax7 in verde e  
del MyoD in rosso.

**Fig.40**



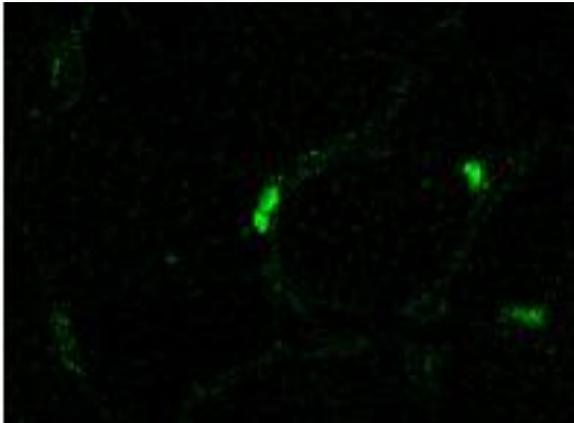
Semitendinoso  
Large white (120 gg post-parto)  
Espressione del gene Pax 7 in verde  
Nuclei cellulari colorati con ioduro di propidio in rosso.  
L'immunolocalizzazione effettuata su sezioni  
trasversali di tessuto muscolare ha mostrato una  
colorazione notevolmente ridotta dell'anticorpo Pax 7.

**Fig. 41**



Quadricipite Femorale  
Large white (60 gg post-parto)  
Espressione del gene Pax 7 in verde  
L'immunolocalizzazione effettuata su sezioni  
trasversali di tessuto muscolare ha mostrato una  
modesta colorazione per l'anticorpo Pax7.

Fig. 42



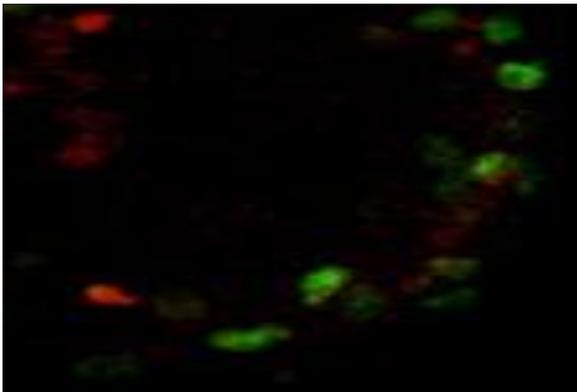
Quadricipite Femorale

Large white (120 gg post-parto)

Espressione del gene Pax 7 in verde

L'immunolocalizzazione effettuata su tessuto muscolare ha mostrato solo pochi nuclei positivi.

Fig. 43

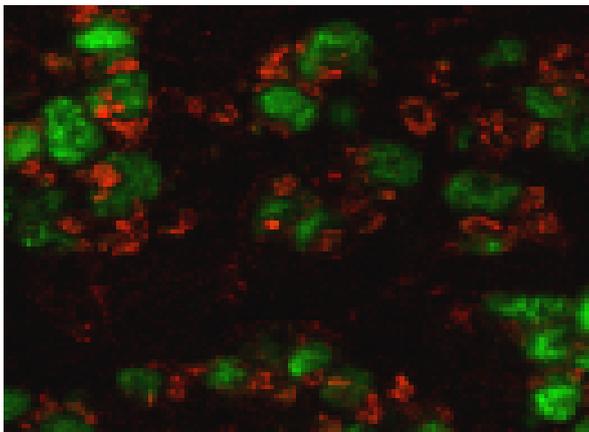


Quadricipite Femorale

Large White (60 gg post-parto)

Espressione del gene Pax7 in verde e del MyoD in rosso.

Fig. 44



Bicipite Femorale

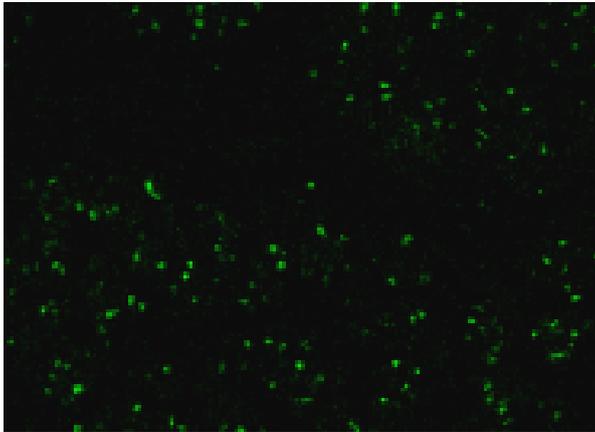
Casertana (30 gg post-parto)

Espressione della miogenina in verde

Espressione della miostatina in rosso

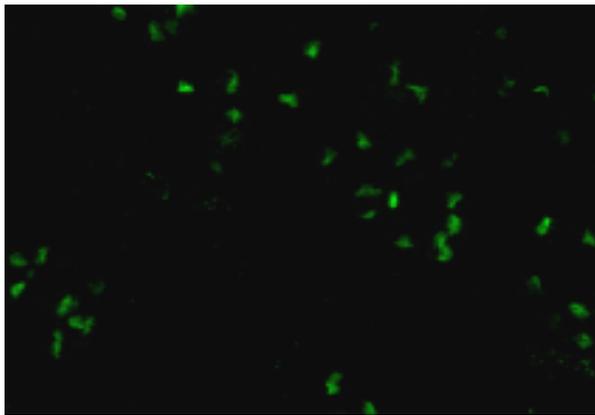
L'ibridazione in situ ha mostrato che la colorazione della miogenina (verde) è stata localizzata nei nuclei delle fibre muscolari dei suini, mentre la localizzazione della miostatina (rossa) è stata localizzata nel citoplasma.

**Fig. 45**



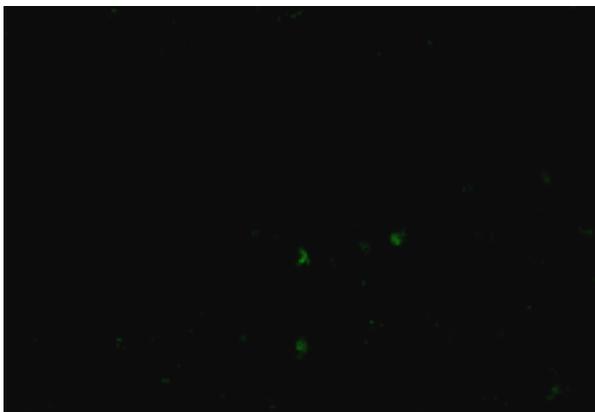
Bicipite Femorale  
Casertana (45 gg post-parto)  
Espressione della miostatina in verde.  
L'ibridazione in situ della miostatina ha mostrato  
una intensa reazione.

**Fig. 46**



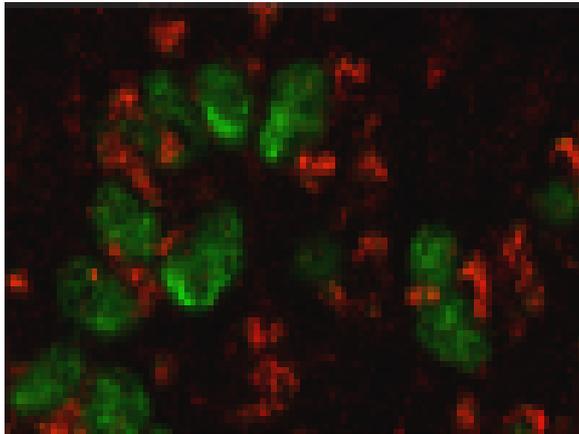
Bicipite Femorale  
Casertana (60 gg post-parto)  
Espressione della miostatina in verde.  
L'ibridazione in situ della miostatina ha mostrato  
che l'intensità e la distribuzione della colorazione  
è stata notevolmente ridotta

**Fig. 47**



Longissimus dorsi  
Casertana (120 gg post-parto)  
Espressione della miostatina in verde.  
L'ibridazione in situ della miostatina ha mostrato  
che l'intensità e la distribuzione della colorazione è  
stata notevolmente ridotta

**Fig. 48**



Bicipite Femorale

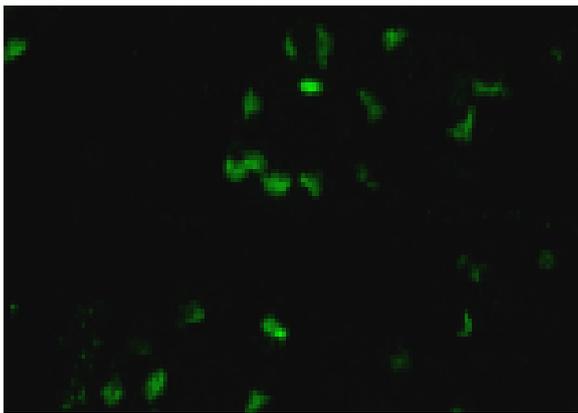
Large White (30 gg post-parto)

Espressione della miogenina in verde.

Espressione della miostatina in rosso.

L'ibridazione in situ ha mostrato che la colorazione della miogenina (verde) è stata localizzata nei nuclei delle fibre muscolari dei suini, mentre la localizzazione della miostatina (rossa) è stata localizzata nel citoplasma.

**Foto 49**



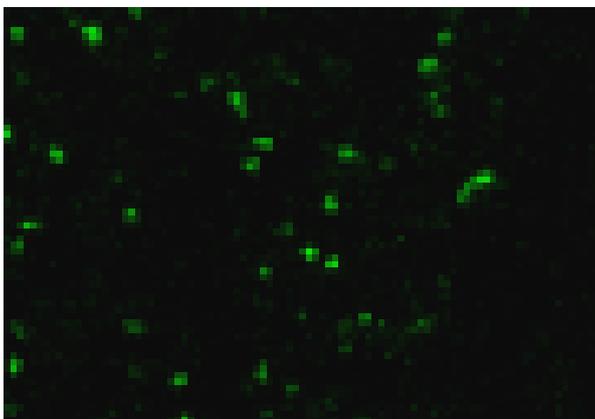
Bicipite Femorale

Large White (45 gg post-parto)

Espressione della miostatina in verde.

L'ibridazione in situ della miostatina ha mostrato una intensa reazione.

**Fig. 50**



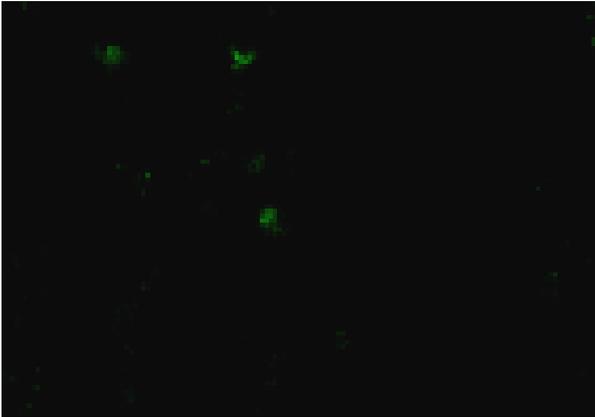
Bicipite Femorale

Large White (60 gg post-parto)

Espressione della miostatina in verde.

L'ibridazione in situ della miostatina ha mostrato che l'intensità e la distribuzione della colorazione si è ridotta

**Fig. 51**



Bicipite Femorale

Large White (120 gg post-parto)

Espressione della miostatina in verde.

L'ibridazione in situ della miostatina ha mostrato che l'intensità e la distribuzione della colorazione è stata notevolmente ridotta

## **Bibliografia**

A.N.A.S Associazione Nazionale Allevatori Suini. 2007. Suini delle razze Large White e Casertana .www.anas.it

ARC (Agricultural Research Council). 1981. The Nutrient Requirements of Pigs. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, England.

Andrè J. 1961. L'alimentation et la cuisine à Rome, dalle "Raccolte". Parigi, 140-151.

Balasini D. 1997. Zootecnia speciale: "Edagricole" 290-291.

Ballerini G. 1999. Allevamento degli animali e trasformazione degli alimenti di origine animale nel mondo omerico, in D. VERA (a cura di), Demografia, sistemi agrari, regimi alimentari nel mondo antico., Bari. : 37-51. Riportato anche nella sezione didattica di questo stesso sito.

Barany M. 1967. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.* 50: 197-218.

Bee G. 2004. Effect of early gestation feeding, birth weight, and gender of progeny on muscle fiber characteristics of pigs at slaughter. *Journal of Animal Science.* 82: 826-836.

Bee G., Solomon M.B., Czerwinski S.M., Long C. and Pursel V.G. 1999. Correlation between histochemically assessed fiber type distribution and isomyosin and myosin heavy chain content in porcine skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 77: 2104-2111.

Beraldo S. and Pata G. 2000 – 2001. Struttura del muscolo scheletrico. Dal sito "Sporttraining".

Bosi P. and Russo V. 2004. The production of the heavy pig for high quality processed products. *Ital. J. Anim. Sci.* 3: 309-321.

Bottinelli R., Canepari M.A., Pellegrino M.A. and Reggiani C. 1996. Force-velocity properties of human skeletal muscle fibres: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. *J. Physiol.* 495: 573-586.

Brocks L., Klont R.E, Buist W., De Greef K., Tieman M., and Engel B. 2000. The effects of selection of pigs on growth rate vs leanness on histochemical characteristics of different muscles. *J. Anim. Sci.* 78: 1247-1254.

Buckingham M. 2006. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 525-532.

Cabras P. and Martelli A. 2004. Chimica degli alimenti: nutrienti, alimenti di origine. 365-369. Piccin Editore.

Calafatti F. Prodotti carnei di suino, tratto da Italy Italia Network (rivista on line).

Carnovale E. Valori Nutrizionali dei salumi italiani, tratto da: "I Nostri Alimenti". I.N.N. II<sup>a</sup> Edizione.

Cattaneo P. 2003. Il muscolo come alimento. *Università degli Studi di Milano*.

Columella. 1979. *De re rustica*, VII, 9.

Coudenys K.T. 1998. The effect of body weight and energy intake on the physical and chemical body composition in growing finishing pigs. M.S. Thesis, Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Guelph, ON, Canada.

Cremaschi D. 1991. "Fisiologia generale, principi". Edi - Ermes, Milano.621 - 642.

de Greef. K.H. 1995. Prediction of growth and carcass parameters. Pages 151–168 in *Modelling Growth in the Pig*. P. J. Moughan, M. W. A. Verstegen, and M. I. Visser-Reyneveld, ed. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands.

Depreux F.F.S., Okamura C.S., Swartz D.R., Grant A.L., Brandsetter A.M. and Gerrard D.E. 2000. Quantification of myosin heavy chain isoform using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Meat. Sci.* 56: 261-269.

Dhawan J. and Rando T.A. 2005. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends. Cell. Biol.* 15: 666-673.

Dwyer C.M., Fletcher J.M. and Stickland N.C. 1993. Muscle Cellularity and Postnatal Growth in the Pig. *J. Anim. Sci.* 71: 3339-3343.

Dwyer C.M. and Stickland N.C. 1991. Sources of variation in myofiber number within and between litters of pigs. *Anim. Prod.* 52: 527-533.

Dwyer C.M. and Stickland N. C. 1994. Supplementation of a restricted maternal diet with protein or carbohydrate alone prevents a reduction in fetal muscle fibre number in the Guinea pig. *Br. J. Nutr.* 72: 173-180.

Dwyer C.M., Stickland N.C. and Fletcher J.M. 1994. The influence of maternal nutrition on muscle fiber number development in the porcine fetus and on subsequent postnatal growth. *J. Anim. Sci.* 72: 911-817.

Edman K.A. 1979. The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcomere length and isometric force in vertebrate muscle fibres. *J. Physiol.* 291:143-159.

Edstrom L.E. and Kugelberg E. 1968. Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. *J. Neurol. Neurosurg. and Psychiat.* 31: 424-433.

Eggert J.M., Depreux F.F.S., Schinckel A.P., Grant A. L. and Gerrard D.E. 2002. Myosin heavy chain isoforms account for variation in pork quality. *Meat Sci.* 61: 117-126.

Eizema K., van den Burg M., Kiri A., Dingboom E.G., van Oudheusden H., Goldspink G. and Weijs W.A. 2003. Differential expression of equine myosin heavy-chain mRNA and protein isoforms in a limb muscle. *J. Histochem. Cytochem.* 51: 1207-1216.

Emmans G.C. and Kyriazakis I. 1995. A general method for predicting the weight of water in the empty bodies of pigs. *Anim. Sci.* 61:103-108.

Essen-Gustavsson B., Karlsson A., Lundstrom K. and Enfalt A.C. 1994. Intramuscular fat and muscle fibre lipid contents in halothane-gene-free pigs fed high or low protein diets and its relation to meat quality. *Meat Sci.* 38: 269-277.

Ezekwe M.O. and Martin R. J. 1975. Cellular characteristics of skeletal muscles in selected strains of pigs and mice and the unselected controls. *Growth* 39:95.

Fonseca S., Wilson I.J., Horgan G.W. and Maltin C.A. 2003. Slow fiber cluster pattern in pig longissimus thoracis muscle: Implications for myogenesis. *J. Anim. Sci.* 81: 973-983.

Gade D. W. 2001. "Hogs (Pigs), in *The Cambridge History of Food, Cambridge*": 536-541.

Geesink G.H. and Koochmaraie M. 1999. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by  $\mu$ -calpain under postmortem conditions. *J. Anim. Sci.* 77: 2685-2692.

Giannone M. 2007. L'Allevamento del suino in Italia. "*Rivista di Agraria*" 36: 1.

Giannone M. 2000. La filiera del biologico è una realtà. "*Rivista di Suinicoltura*". 12.

Giannone M. 2000. Le regole d'oro per produrre il suino bio. "*Rivista di suinicoltura*". 11.

Giannone M. 2002. Razze autoctone alla riscossa. "Rivista di suinicoltura". 4.

Gondret F., Lefaucheur L., Louveau I., Lebret B., Pichodo X., and Le Cozler Y. 2005b. Influence of piglet birth weight on postnatal growth performance, tissue lipogenic capacity, and muscle histological traits at market weight. *Livest. Prod. Sci.* 93: 137-146.

Gondret F., Lefaucheur L., Juin H., Louveau I. and Lebret B. 2005. Low birth weight is associated with enlarged muscle fiber area and impaired meat tenderness of the longissimus muscle in pigs. *J. Anim. Sci.* 84: 93-103.

Guth L. and Samaha F.J. 1970. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp. Neurol.* 28: 365-367.

Halevy O., Piestun Y., Allouh M.Z., Rosser B.W., Rinkevich Y., Reshef R., Rozenboim I., Wleklinski-Lee M. and Yablonka-Reuveni Z. 2004. Pattern of Pax7 expression during myogenesis in the posthatch chicken establishes a model for satellite cell differentiation and renewal. *Dev. Dyn.* 231: 489-502.

Handel S.E. and Stickland N.C. 1987. Muscle cellularity and birth weight. *Anim. Prod.* 44: 311.

Handel S.E. and Stickland N.C. 1987 The growth and differentiation of porcine skeletal muscle fibre types and the influence of birth weight. *J. Anat.* 152: 107-119.

Hendriks W.H. and Moughan P.J. 1993. Whole-body mineral composition of entire male and female pigs depositing protein at maximal rates. *Livest. Prod. Sci.* 33: 161-170.

Ilian M.A., Morton J.D., Kent M.P., Le Couteur C.E., Hickford J., Cowley R. and Bickerstaffe R. 2001. Intermuscular variation in tenderness: Association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. *J. Anim. Sci.* 79: 122-132.

INRAN - Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione 2007 "La Qualità della carne suina".

Istat "La consistenza degli allevamenti bovini e suini al 1° giugno 2006".

Karlsson A.H., Klont R.E. and Fernandez X. 1999. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livest. Prod. Sci.* 60: 255-269.

Klont R.E., Brocks L. and Eikelenboom G. 1998. Muscle fibre type and meat quality. *Meat Sci.* 49: S219-S229.

Koishi K., Zhang M., McLennan I.S. and Harris A.J. 1995. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. *Dev. Dyn.* 202: 244-254.

Koohmaraie M. 1992. The role of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteinase (calpains) in post-mortem proteolysis and meat tenderness. *Biochimie (Paris)* 74: 239-245.

Kuhn G., Rehfeldt C., Hartung M. and Ender K. 2002. Heavy newborn piglets develop a high carcass quality. *Fleischwirtsch.* 82: 128-129.

L. Iunius Moderatus Columella *DE RE RUSTICA, LIBER SEPTIMUS*.

Larzul C., Lefaucheur L., Ecolan P., Gogué J., Talmant A., Sellier P., Le Roy P. and Monin G. 1997. Phenotypic and genetic parameters for longissimus muscle fiber characteristics in relation to growth, carcass, and meat quality traits in Large White pigs. *J. Anim. Sci.* 75: 3126-3137.

Latorre R., Gil F., Vazquez J.M., Moreno F., Mascarello F. and Ramirez G. 1993. Skeletal muscle fibre types in the dog. *J. Anat.* 182: 329-337.

Le Cozler Y., Pichodo X., Roy H., Guyomarc'h C., Pellois H., Quiniou N., Louveau I., Lebret B., Lefaucheur L. and Gondret F. 2004. Influence du poids individuel et de la taille de la portée à la naissance sur la survie du porcelet, ses performances de croissance et d'abattage et la qualité de la viande. *Journ. Rech. Porcine* 36: 443-450.

Lebret B., Mourot J. and Lefaucheur L. 1999. La qualité de la viande de porc. Influence des facteurs d'élevage non génétiques sur les caractéristiques du tissu musculaire. *INRA Prod. Anim.* 12: 11-28.

Lefaucheur L., Edom F., Ecolan P. and Butler-Browne G.S. 1995. Pattern of muscle fiber type formation in the pig. *Dev. Dyn.* 203: 27-41.

Lefaucheur L. 1986 Postnatal changes in some histochemical and enzymatic characteristics of three pig muscles. *Meat Sci.* 16: 199-216.

Lefaucheur L., Ecolan P., Plantard L. and Gueguen N. 2002 New insights into muscle fiber types in the pig. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 719-730.

Lengerken G., Wicke M. and Maak S. 1997. Stress susceptibility and meat-quality situation and prospects in animal breeding and research. *Arch. Anim. Breed.* 40: 163-171.

Lucas C.A., Kang L.H. and Hoh J.F. 2000. Monospecific antibodies against the three mammalian fast limb myosin heavy chains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272: 303-308.

Maltin C.A., Warkup C.C., Matthews K.R., Grant C.M., Porter A.D. and Delday M.I. 1997. Pig muscle fiber characteristics as a source of variation in eating quality. *Meat Sci.* 47: 237-248.

Mappatura dei Prodotti Tipici e Tradizionali 2005 - Regione Campania, Settore Se. SIRCA.

Mascarello F., Stecchini M.L., Rowleron A. and Ballocchi E. 1992 Tertiary myotubes in postnatal growing pig muscle detected by their myosin isoform composition. *J. Anim. Sci.* 70. 1806-1813.

Matsakas A., Bozzo C., Cacciani N., Caliaro F., Reggiani R., Mascarello F. and Patruno M. 2006. Effect of swimming on myostatin expression in white and red gastrocnemius muscle and in cardiac muscle of rats. *Exp. Physiol.* 91: 983-994.

Melli L. 2002. Le caratteristiche delle fibre muscolari: "Atleticanet".

Melli L. 2002 Contrazione muscolare ed energia : "Atleticanet".

Mesires N.T. and Doumit M.E. 2002. Satellite cell proliferation and differentiation during postnatal growth of porcine skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 282: 899-906.

Miller L.R., Ganwood V.A. and Judge M.D. 1975. Factors affecting porcine muscle fiber type, diameter and number. *J. Anim. Sci.* 41:66.

Ministero Americano dell'Agricoltura .2007. "Database sulla composizione della carne suina".

Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali Large White italiana: Origine, diffusione e caratteristiche produttive.

Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, Casertana: Origine, diffusione e caratteristiche produttive.

Moughan P.J., Smith W.C. and Stevens E.V.J. 1990. Allometric growth of chemical body components and several organs in the pig (20-90 kg Liveweight). *N. Z. J. Agric. Res.* 33:77-83.

Nachlas M.M., Tsou K.C., De Souza E., Cheng C. and Seligman A.M. 1957. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazale. *J. Histochem. Cytochem.* 5: 420-436.

Ouali A. and Talmant A.1990. Calpains and calpastatin distribution in bovine, porcine and ovine skeletal muscles. *Meat Sci.* 28, 331.

Ozawa S., Mitsuhashi T., Mitsumoto M., Matsumoto S., Itoh N., Itagaki K., Kohno Y. and Dohgo. T. 2000. The characteristics of muscle fiber types of longissimus thoracis muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese Black steers. *Meat Science.* 54: 65-70.

Padykula H.A. and Hermann E. 1955. The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 3: 110-183.

Patini P. and Orlandi V. 2007. Il Maiale Nero nella Tradizione di terra di lavoro. "Rivista di agraria" N. 39 del 15 maggio 2007.

Patruno M., Caliaro F., Maccatrozzo L., Sacchetto R., Martinello T., Toniolo L., Reggiani C. and Mascarello F. 2007. Myostatin shows a specific expression pattern in pig skeletal and extraocular muscles during pre-natal and post-natal growth. *Differentiation*, doi:10.1111/j.1432- 0436.2007.00189.x.

Patruno M., Caliaro F., Martinello T. and Mascarello F. 2007. Expression of the paired box domain Pax7 protein in myogenic cells isolated from the porcine semitendinosus muscle after birth. *Churchill Livingstone.* 40: 1-6.

Pellegrino M.A., Canepari M., D'Antona G., Reggiani C. and Bottinelli R. 2003. Orthologous myosin isoforms and scaling of shortening velocity with body size in mouse, rat, rabbit and human muscles. *J. Physiol.* 546: 677-689.

Picard B., Barboiron C., Duris M. P., Gagniere H., Jurie C. and Geay Y. 1999. Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Sci.* 53: 1-7.

Picard B. and Cassar-Malek I. 2009. Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls. *Meat Sci.*82: 30-36.

Picard B., Lefaucheur L., Berri C. and Duclos M.J. 2002. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod. Nutr. Dev.* 42: 415-431.

Piciocchi N. 2008. Suino Nero Casertano. "Rivista di Agraria 53.

Plinio il Vecchio *Naturalis Historia*, XXXI, 9.

Poore K.R. and Fowden A.L. 2004. The effects of birth weight and postnatal growth patterns on fat depth and plasma leptin concentrations in juvenile and adult pigs. *J. Physiol.* 558: 295-304.

Poleskaya A., P. Seale and M.A. 2003. Rudnicki, Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell* 113: 841-852.

Powell S.E. and Aberle E.D. 1980. Effects of birth weight on growth and carcass composition of swine. *J. Anim. Sci.* 50:860.

"Rivista on line di prodotti tipici campani":Prodotti tipici.

Roehe R. and Kalm. E. 2000. Estimation of genetic and environmental risk factors associated with pre-weaning mortality in piglets using generalized linear mixed models. *Anim. Sci.* 70: 227-240

Rota G. Strutture e Attrezzature per la Zootecnia. "Attrezzature per porcilaie".

Rota G. Strutture e Attrezzature per la Zootecnia. "Impianti e alimentazione a secco".

Rota G. Strutture e Attrezzature per la Zootecnia. "Soluzioni prefabbricate per porcilaie innovative".

Ryu Y.C. and Kim B.C. 2006. Comparison of histochemical characteristics in various pork groups categorized by postmortem metabolic rate and pork quality. *J. Anim. Sci.* 84: 894-901.

Ryu Y.C. and Kim B.C. 2005. The relationship between muscle fiber characteristics, post mortem metabolic rate, and meat quality of pig longissimus dorsi muscle. *Meat Sci.* 71: 351-357.

Ryu Y.C., Rhee M.S. and Kim B.C. 2004. Estimation of correlation coefficients between histological parameters and carcass traits of pig Longissimus dorsi muscle. *Asian - Aust. J. Anim. Sci.* 17: 428-433.

Salvaterra M. Maiale domestico di razza Casertana: classificazione e origine. "Rivista di Agraria "

Salvaterra M. Razze suine migliorate: Large White. Classificazione e origine. "Rivista on line di Agraria ".

Scapolo P.A, Rowleron A.M., Mascarello F. and Veggetti A. 1991. Neonatal myosin in bovine and pig tensor tympani muscle fibres. *J. Anat.* 178-255.

Schiaffino S., Gorza L., Sartore S., Saggin L., Ausoni S., Vianello M., Gundersen K. and Lomo T. 1989. Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 10: 197-205.

Schiaffino S. and Reggiani C. 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.* 76: 371-423.

Schiaffino S. and Reggiani C. 1994. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 77: 493-501.

Seale P., Sabourin L.A., Girgis-Gabardo A., Mansouri A., Gruss P. and Rudnicki M.A. 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102:777-786.

Serrano A.L., Petrie J.L., Rivero J.L. and Hermanson J. W. 1996. Myosin isoforms and muscle fibre characteristics in equine Gluteus medius muscle. *Anat. Rec.* 244: 444-451.

Smerdu V., Karsch-Mizrachi I., Campione M., Leinwand L. and Schiaffino S. 1994. Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* 267: C1723-C1728.

Solomon M.B. and Dunn M. C. 1988. Simultaneous histochemical determination of three fiber types in single section of Ovine, Bovine and Porcine Skeletal muscle. *J. Anim. Sci.* 66: 255-264.

Sorini Revelli A. 2002-2007 Storia del maiale. "Rivista multimediale di alimentazione e tradizioni" a cura dell'Accademia Italiana Gastronomia storica.

Stickland N.C. and Handel S.E. 1986. The numbers and types of muscle fibres in large and small breeds of pigs. *J. Anat.* 147:181.

Swatland H.J. 1975. Histochemical development of myofibres in neonatal piglets. *Res. Vet. Sci.* 18:253-257.

Suzuki A. and Cassens R.G. 1980. A histochemical study of myofiber types in muscle of the growing pig. *J. Anim. Sci.* 51: 1449-1461.

Tamaki T., Akatsuka A., Kiyoshi A., Nakamura Y., Matsuzawa H., Hotta T., Roy R.R. and Edgerton V.R: 2002. Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 4: 571-577.

Tamaki T., Akatsuka A., Okada Y., Matsuzaki Y., Okano H., Kimura M. 2003. Growth and differentiation potential of main and side-population cells derived from murine skeletal muscle. *Exp. Cell. Res.* 291: 83-90.

Toniolo L., Patruno M., Maccatrozzo L., Pellegrino, Canepari M., Rossi R., D'Antona G., Bottinelli R., Reggiani C. and Mascarello F. 2004. Fast fibers in a large animal: fiber types, contractile properties and myosin expression in pig skeletal muscles. *J. Exp. Biol.* 207: 1875-1886.

Velotto S., Varricchio E., Di Prisco M.R., Stasi T. and Crasto A. 2007. Skeletal myocyte Types and vascularity in the Black Sicilian Pig. *Acta Vet. Brno.* 76: 163-170.

Velotto S., Vitale C., Stasi T. and Crasto A. 2010. New Insights into Muscle Fibre Types in Casertana Pig. *Acta Vet. Brno.* 79: 169-176.

Vera D. 2000. Nutrire, divertire, commerciare, amministrare: aspetti della storia urbana di Roma tardo antica, in *Aurea Roma: dalla città pagana alla città cristiana*, Roma: 330-336.

Vera D. 1999. "Del suino e delle sue carni nella storia", Bari: 347-355.

Virlovet C. 2000. L'approvvigionamento di Roma imperiale: una sfida quotidiana, in E. LO CASCIO (a cura di), *Roma imperiale. Una metropoli antica*, Roma: 103-135.

Voet D. Voet J.G. 1993. "Biochimica". Zanichelli, Bologna. 1290-1302.

Walls E.W. 1960. The structure and function of muscle. *Academic Press*. New York. 1, 21.

Ward, S.S. and Stickland N.C. 1991. Why are slow and fast muscles differentially affected during prenatal undernutrition? *Muscle Nerve* 14: 259-267.

Weis R.N. 2001. Independent effects of energy intake and body weight on physical and chemical body composition in growing pigs. M.S. Thesis, Department of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Guelph, ON, Canada.

Whittemore C.T. 1983. Development of recommended energy and protein allowances for growing pigs. *Agric. Systems*. 11:159-186.

Wigmore P.M.C. and Stickland N.C. 1983. Muscle development in small and large pig fetuses. *J. Anat.* 137: 235-245.

Wolter B.F., Ellis M., Corrigan B.P. and De Decker J.M. 2002. The effect of birth weight and feeding of supplemental milk replacer to piglets during lactation on pre-weaning and postweaning growth performance and carcass characteristics. *J. Anim. Sci.* 80: 301-308.

Zammit P.S., Relaix F., Nagata Y., Ruiz A.P., Collins C.A., Partridge T.A. and Beauchamp J.R. 2006. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells *J. Cell. Sci.* 119: 1824-1832.

Zanon A. Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma - Associazione R.A.R.E. Razze Suine Autoctone Italiane Antiche. "Rivista on line di Agraria" Zootecnia biologica, Opuscolo C.R.P.A, 7.1. n.1/2001, Reggio Emilia.

Zhong W.W., Lucas C.A., Kang L.H. and Hoh J.F. 2001. Electrophoretic and immunochemical evidence showing that marsupial limb muscles express the same fast and slow myosin heavy chains as eutherians. *Electrophoresis*. 22: 1016-1020.